

Estudo da Síntese de Péptidos Inibidores da Trombina da Mosca Tsé-tsé

Ana Rita Carvalho Gonçalves Veloso

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

2015

Orientador

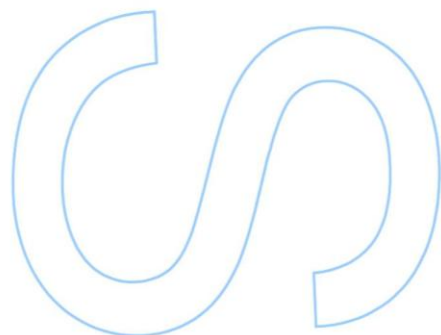
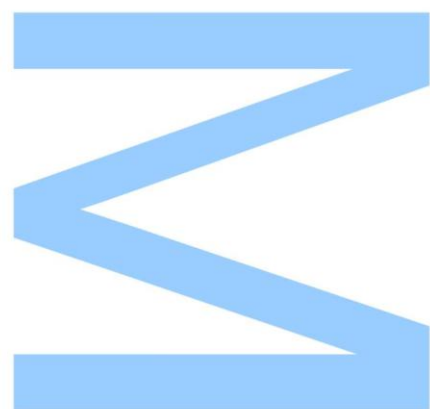
Professora Doutora Paula Alexandra de Carvalho Gomes

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Doutor Nuno Filipe de Sousa Vale

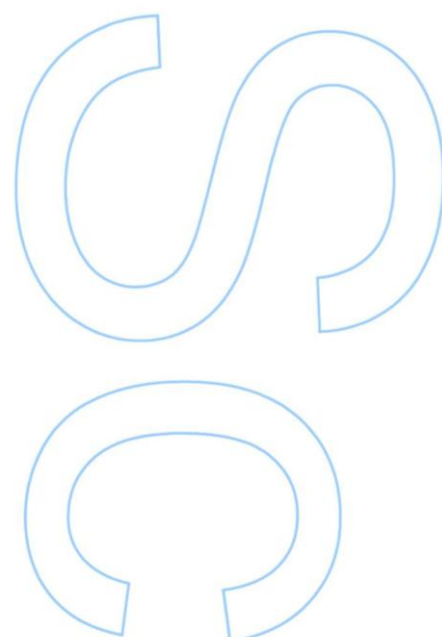
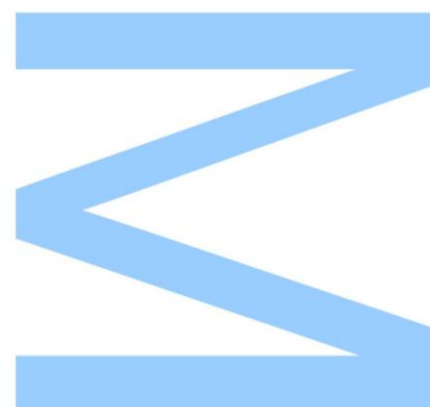
UCIBIO/REQUIMTE- Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Para o Francisco

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Prof^a Doutora Paula Gomes todo o carinho, todas as oportunidades e todos os momentos de aprendizagem que me proporcionou. Igualmente, devo agradecer ao Doutor Nuno Vale por ter sido incansável nesta batalha, pela paciência, pela dedicação, pela disponibilidade e pela coorientação ao longo deste ano.

Às minhas colegas do laboratório, agradeço o companheirismo e apreço, a boa-disposição e os momentos de diversão quando o dia não corria da melhor forma; Um agradecimento especial às amigadas da Abigail e da Joana Noronha.

Aos meus amigos: Daniela, Vanessa, João Almeida, João Sousa, Virgílio, Claudia, Bárbara, Joana Alves, Filipa, Luísa Fonseca, Pedro Fernandes, Inês Sá, Diana, Fábio, Isabel e muitos outros que me acompanharam nesta jornada incrível, muito obrigada pela amizade e por todos os momentos inesquecíveis que passei ao vosso lado.

Ao meu Afilhado Leandro, obrigada por teres sido fantástico e olhares para mim como um exemplo, fizeste-me crescer enquanto pessoa. Serás sempre muito especial para mim.

Ao meu melhor amigo e mais-que-tudo João Barbosa, que apesar de tudo esteve sempre do meu lado e me apoiou nos momentos mais difíceis e críticos. Fizeste com que acreditasse novamente em mim, adoro-te.

Um especial agradecimento ao meu Padrinho, amigo e braço-direito, Diogo Silva, por me mostrar o que é força de vontade, por enveredar em projetos comigo, por confiar e se orgulhar de mim mas acima de tudo por me ajudar a ser uma pessoa melhor! Obrigada pelos teus ensinamentos e voto de confiança.

Devo agradecer aos meus avós Abraão e Celeste e aos meus irmãos Leonardo e Hilário, pelo apoio constante e incondicional.

E, por último mas sem nunca esquecer, estou eternamente agradecida à minha mãe por ser o meu exemplo de força, a minha guerreira, por vencer todos os obstáculos, por batalhar todos os dias para me dar uma vida melhor e me incutir os valores e princípios mais corretos. Não seria quem sou hoje se não fosses tu. Não tenho palavras para descrever o quanto te amo.

Resumo

A mosca tsé-tsé é um importante vetor da tripanossomíase africana (ou doença do sono) que é provocada pelo parasita protozoário *Trypanosoma brucei*. Estes parasitas são injectados pela mosca tsé-tsé na pele do hospedeiro humano, no decurso da refeição sanguínea do inseto. A saliva da mosca tsé-tsé contém um potente inibidor da coagulação sanguínea em mamíferos, o péptido TTI (do inglês, *tse-tse thrombin inhibitor*), que, por isso, apresenta um grande potencial terapêutico, quer contra a doença do sono, quer como anticoagulante para desordens cardiovasculares.

O trabalho desta dissertação teve como objetivo principal a síntese e caracterização do péptido TTI e de três derivados O-sulfatados, por substituição de resíduos de tirosina por resíduos de O-sulfotirosina. A metodologia de síntese usada foi a Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPPS), usando o esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu. Os resíduos de O-sulfotirosina foram incorporados na forma lateralmente protegida com o grupo neopentilo, o que impediu a aplicação de procedimentos habituais em síntese peptídica, nomeadamente, em passos envolvendo condições ácidas.

Os péptidos foram sintetizados com sucesso, quer por metodologia clássica de SPPS, quer assistida por microondas (MW-SPPS), sendo posteriormente purificados por cromatografia líquida de fase reversa de média pressão (RP-MPLC). A análise dos péptidos purificados finais foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por espetrometria de massa com ionização por eletronebulização e deteção por armadilha de iões Orbitrap (LC-ESI/MS Orbitrap), permitindo confirmar a identidade e elevado grau de pureza dos péptidos-alvo.

Abstract

Tsetse flies are an important vector of African trypanosomiasis (or sleeping sickness) caused by protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. These parasites are injected by tsetse fly on the skin of the human host, in the course of insect blood meal. The saliva of tsetse flies contains a potent inhibitor of blood coagulation in mammals, the tsetse thrombin inhibitor (TTI) peptide, which has great therapeutic potential against sleeping sickness or as anticoagulant for cardiovascular disorders.

The work of this thesis aimed at the synthesis and characterization of peptide TTI and three derivatives, obtained by replacing tyrosine residues by their O-sulfated counterparts. The methodology used for synthesis of these peptides was Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS), using the standard Fmoc/^tBu orthogonal protection scheme. O-sulfated tyrosines were incorporated with their side chains protected with the neopentyl group, which prevented application of standard procedures in peptide synthesis, particularly on those steps where acidic conditions are currently employed.

The peptides were successfully synthesized by SPPS either by using classical methodology or employing microwave-assisted techniques (MW-SPPS) and were subsequently purified by reverse-phase liquid chromatography at medium pressure (RP-MPLC). The final analysis of the purified peptides was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray ionization-orbitrap detection mass spectrometry (LC-ESI/MS Orbitrap), allowing to confirm both the identity and the excellent purity degrees of the target peptides.

Índice Geral

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Índice Geral	ix
Índice de Esquemas	xii
Índice de Figuras	xiv
Índice de Tabelas	xx
Glossário	xxi
1. Introdução	1
1.1 Síntese de péptidos em fase sólida	2
1.1.1 Esquemas de proteção	4
1.1.2 Suporte sólido	5
1.1.3 Condensação <i>in situ</i> mediada por sais de urónio	9
1.1.4 Teste de Kaiser	11
1.1.5 Síntese peptídica assistida por micro-ondas	12
1.2 Síntese de sulfo-péptidos em fase sólida	15
1.2.1 Sulfatação química após construção da cadeia peptídica	17
1.2.2 Incorporação direta dos resíduos de sulfotirosina no péptido em crescimento	21
a) Uso de sais de sódio e tetra-alquilamónio para proteção lateral de sTyr	21
b) Uso do grupo neopentilo para proteção lateral de sTyr	23
c) Uso do 2,2,2- tricloroetilo e derivados para proteção lateral de sTyr	24
1.2.3 Síntese divergente de péptidos com múltiplas tirosinas sulfatadas	28
1.3 Importância biológica da tirosina sulfatada	30
1.4 Péptido TTI	35
2. Objetivo	38
3. Procedimento Experimental	39

3.1 Esquema de montagem	39
3.2 Reagentes e equipamentos utilizados.....	40
3.3 Preparação do teste de Kaiser (teste da ninidrina).....	40
3.4 Preparação da Resina	41
3.5 Acoplamento dos aminoácidos.....	42
3.6 Clivagem do péptido e desproteção das cadeias laterais	42
3.6.1 Clivagem com filtração da resina na solução de TFA	42
3.6.2 Clivagem com filtração da resina na solução de AcOH	43
3.7 Remoção do grupo neopentilo das tirosinas sulfatadas.....	43
3.7.1 Método do acetato de amónio em água	44
3.7.2 Método da azida de sódio em DMSO	44
3.7.3 Método da azida de sódio em água ultrapura.....	44
3.8 Purificação dos péptidos	44
3.8.1 Purificação do Péptido TTI	45
3.8.2 Purificação das variantes sulfatadas do Péptido TTI	45
4. Resultados e Discussão.....	46
4.1 Síntese do segmento C-terminal de 20 aminoácidos	46
4.2 Síntese dos péptidos-alvo	49
4.2.1 Elongamento das cadeias peptídicas por SPPS manual	49
4.2.2 Clivagem das peptidil-resinas por acidólise com TFA.....	50
4.2.2.1 Péptido TTI	50
4.2.2.2 Péptido ¹² sTyr(nP)-TTI	53
4.2.2.3 Péptido ⁹ sTyr(nP)-TTI	56
4.2.2.2 Péptido ^{9,12} sTyr(nP)-TTI	58
4.3 Remoção do grupo neopentilo	61
4.3.1 Péptido ¹² sTyr-TTI e ⁹ sTyr-TTI.....	61
4.3.2 Péptido ^{9,12} sTyr-TTI	64
4.3.3 Influência do tamanho do péptido no sucesso da desproteção.....	70
4.4 Nova abordagem à síntese do péptido ^{9,12} sTyr(nP)-TTI	78
4.4.1 Síntese do péptido ^{9,12} sTyr(nP)-TTI por MW-SPPS automatizada	78
4.4.2 Desproteção do péptido ^{9,12} sTyr(nP)-TTI por remoção de grupos nP ...	79

4.4.2.1 Método da azida de sódio.....	79
a) uso de DMSO como solvente	80
b) uso de água ultra-pura como solvente	81
4.4.2.2 Método do acetato de amónio	84
a) sem qualquer controle prévio	84
b) com controle prévio da secagem do péptido protegido	87
c) com acerto de pH no início de reação de desproteção	88
4.5 Purificação dos péptidos-alvo.....	90
4.5.1 Purificação do péptido TTI.....	90
4.5.2 Purificação dos derivados sulfatados do péptido TTI.....	91
5. Conclusão.....	95
Referências Bibliográficas	96

Índice de Esquemas

Esquema 1: Esquema geral de Síntese Peptídica em Fase Sólida.....	3
Esquema 2: Esquema reacional da remoção do grupo Fmoc com piperidina	9
Esquema 3: Esquema de reação da formação da ligação amida [adaptado da ref.17].	10
Esquema 4: Esquema reacional da ativação do componente carboxilo com um sal de urónio (TBTU ou HBTU) [adaptado da ref.17].	11
Esquema 5: Esquema de formação do "púrpura de Ruhemann" por reação da ninidrina e o grupo amino primário de um α - aminoácido [1].	12
Esquema 6: Hidrólise da tirosina sulfatada (via do lado direito) e estabilização por contra-íão X^+ (via do lado esquerdo) da cadeia lateral de resíduo de sulfotirosina (fenol O-sulfatado) [28,29].	16
Esquema 7: Sulfatação " <i>on resin</i> " de uma tirosina seletivamente desprotegida por reação com SO_3 -DMF ou complexos de SO_3 -Pyr. Os grupos protetores (GP) noutros aminoácidos sensíveis são o Msib (proteção de grupos hidroxilo) ou o Msz (proteção de grupos amino). $X = -O-$ ou $-NH-$ para síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido da ref. 35]......	18
Esquema 8: Via geral de síntese de um péptido sulfatado por SPPS usando Fmoc/ ^t Bu e resina 2-Clt, com incorporação dos resíduos de tirosina a serem seletivamente sulfatados ortogonalmente O-protegidos com o grupo Azm; os resíduos de tirosina que não se pretenda sulfatar deverão ser O-protegidos com o grupo Bzl, que requer um processo de clivagem em duas etapas [reproduzido da ref. 36]......	20
Esquema 9: Esquema de desproteção e clivagem final de sulfopéptidos em resina 2-Clt por incorporação seletiva de Fmoc-Tyr($SO_3^-Na^+$)-OH [reproduzido da ref. 39].	22
Esquema 10: Esquema de desproteção e clivagem final de um sulfopéptido por incorporação direta de sTyr protegida lateralmente com o grupo nP. A clivagem e desproteção da resina são conseguidas em condições correntes de SPPS via esquema Fmoc/ ^t Bu, na presença de <i>scavengers</i> sem enxofre, como o triisopropilsilano (TIS) e água. O grupo nP é removido por tratamento pós-clivagem do péptido com acetato de amónio ou azida sódica. $X = -O-$ ou $-NH-$ para síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido das refs. 42 e 43].	24
Esquema 11: Esquema de síntese de um sulfopéptido usando sulfotirosinas protegidas lateralmente com o grupo TCE; A) via de síntese para o Fmoc-Tyr(SO_3 TCE)-OH que vai ser utilizado posteriormente em B) síntese em fase sólida do sulfopéptido pretendido. Os procedimentos correntes em SPPS pela via Fmoc/ ^t Bu são compatíveis com o uso do grupo TCE, que é removido após a clivagem através de hidrogenação	

catalítica. X= -O- ou -NH- para síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido da ref. 47].....	25
Esquema 12: Síntese de um sulfopéptido usando resíduos de sTyr protegidos lateralmente com o grupo DCV. A) Preparação de um sal de DCV para ser usado em B) Síntese prévia do derivado protegido, Fmoc-Tyr(SO ₃ DCV)-OH, para ser usado em C) síntese em fase sólida do sulfopéptido pretendido, mediante procedimentos correntes em SPPS pela via Fmoc/ ^t Bu; a remoção do DCV é conseguida através da hidrogenação após a clivagem. X= -O- ou -NH- para a síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido da ref. 38].....	27
Esquema 13: A) Proteção ortogonal das cadeias laterais de três resíduos de tirosina da mesma sequência peptídica de partida, permitindo a síntese divergente de sete péptidos com diferentes padrões de sulfatação. B) Sulfatação “on resin” de resíduo (s) de tirosina (s) desprotegido (s) [reproduzido da ref. 27].	29
Esquema 14: PTS de um péptido através da sulfatação da tirosina. As tirosilproteína sulfotransferases (TPST) catalisam a transferência de um grupo sulfato da 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS, do inglês <i>3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate</i>) para o substrato do péptido, com libertação concomitante de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP, do inglês <i>3'-phosphoadenosine-5'-phosphate</i>) [52]. .	31
Esquema 15: Representação esquemática do recetor transmembranar, com as suas regiões extracelular (ectodomínio) e intracelular (endodomínio). Os ectodomínios estão geralmente envolvidos no contacto com outras superfícies, desencadeando-se processos de sinalização celular [adaptado da ref.78]	33
Esquema 16: Esquema da montagem experimental para SPPS manual	39

Índice de Figuras

Figura 1: Resinas mais comuns para a síntese de peptidil-carboxamidas pelo método Fmoc/ ^t Bu (estrutura molecular explícita apenas para o espaçador; polímero genérico representado por esfera cinzenta).	7
Figura 2: Estrutura da resina Fmoc-Rink Amida MBHA, onde o polímero de base se representa por P.	8
Figura 3: Sintetizador automático utilizado em MW-SPPS (CEM Liberty 1).	14
Figura 4: Representação esquemática das vias biológicas da sulfatação de tirosinas numa proteína (PTS). A integração do grupo sulfato em tirosinas em proteínas e os seus efeitos sobre interações proteína-proteína induzem diversas respostas fisiológicas e têm sido associados a diferentes patologias [Adaptado da ref. 66].	34
Figura 5: Estrutura molecular do péptido TTI e respetiva identificação dos aminoácidos que o constituem.	37
Figura 6: Resultado positivo (azul escuro, grupos amino livres, ou seja, resultado esperado após uma desproteção) e negativo (amarelo pálido, grupos amino protegidos, ou seja, resultado esperado após um acoplamento) do teste da ninidrina.	41
Figura 7. Cromatograma do péptido 20AA, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C ₁₈ , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. .	47
Figura 8. Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do péptido 20AA...	47
Figura 9: Cromatograma do péptido TTI, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C ₁₈ , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. .	52
Figura 10: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do péptido TTI. ...	52
Figura 11: Cromatograma do péptido bruto ¹² sTyr(nP)-TTI, obtido por clivagem de acordo com o procedimento descrito em 3.6.1. Análise realizada em sistema HPLC-DAD com coluna C ₁₈ , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	53
Figura 12: Cromatograma do péptido bruto ¹² sTyr(nP)-TTI, obtido por clivagem de acordo com o procedimento descrito em 3.6.2. Análise realizada em sistema HPLC-DAD com coluna C ₁₈ , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	54

Figura 13: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=14,0$ minutos, ver Figuras 11 e 12) do produto bruto de síntese do péptido $^{12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$.	55
Figura 14: Cromatograma do péptido $^9\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	56
Figura 15: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=14,0$ minutos, ver Figura 14) do produto bruto de síntese do péptido $^9\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$.	57
Figura 16: Cromatograma do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	58
Figura 17: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=16$ minutos, ver Figura 16) do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$.	59
Figura 18: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B ($t_r=14,1$ minutos, ver Figura 16) do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$.	60
Figura 19: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C ($t_r=14,3$ minutos, ver Figura 16) do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$.	60
Figura 20: Cromatograma do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao péptido $^{12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	61
Figura 21: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=12,1$ minutos, ver Figura 20) do produto bruto de síntese do péptido $^{12}\text{sTyr-TTI}$.	62
Figura 22. Cromatograma do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao péptido $^9\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	63
Figura 23: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=12,2$ minutos, ver Figura 22) do produto bruto de síntese do péptido $^9\text{sTyr-TTI}$.	64

- Figura 24: Cromatogramas dos produtos brutos obtidos após aplicação do método de remoção do grupo nP pelo acetato de amónio a 1,5 M e A. dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em acetonitrilo; B. dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água; C. dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água, sem agitação. As análises foram realizadas em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. 67
- Figura 25: Cromatogramas dos produtos brutos obtidos após aplicação do método de remoção do grupo nP pelo acetato de amónio A. a 37 °C e à concentração de 2,0 M, dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em acetonitrilo; B. a 37 °C e à concentração de 1,5 M, dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água; C. a 30 °C e à concentração de 1,0 M, dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água. As análises foram efetuadas em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. 69
- Figura 26: Perfil cromatográfico da fase etérea, após clivagem da peptidil-resina onde havia sido construído o hexapéptido modelo. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. 71
- Figura 27: Perfil cromatográfico da fase etérea, após extração líquido-líquido da peptidil-resina onde havia sido construído o hexapéptido modelo. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. 71
- Figura 28: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B ($t_r=14,2$ minutos, ver Figura 27) do produto bruto de síntese do hexapéptido modelo. 72
- Figura 29: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C ($t_r=14,4$ minutos, ver Figura 27) do produto bruto de síntese do hexapéptido modelo. 73
- Figura 30: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=15,1$ minutos, ver Figura 27) do produto bruto de síntese do hexapéptido modelo. 73
- Figura 31: Cromatograma do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm. 74

Figura 32: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=4$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.	75
Figura 33: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B' ($t_r=8.1$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.	75
Figura 34: . Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C' ($t_r=8.5$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.	76
Figura 35: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente D' ($t_r=6,0$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.	76
Figura 36: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente E' ($t_r=8,3$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.	77
Figura 37: Cromatograma do péptido bruto $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ sintetizado automaticamente, obtido por clivagem de acordo com o procedimento descrito em 3.6.1. Análise realizada em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	79
Figura 38: Cromatograma do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ impuro com azida de sódio em DMSO. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	80
Figura 39: Cromatograma do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ impuro com azida de sódio em água ultra-pura. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	81
Figura 40: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=13$ minutos, ver Figura 38) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ com azida de sódio em água ultra-pura.	82
Figura 41: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B' ($t_r=9,5$ minutos, ver Figura 38) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ com azida de sódio em água ultra-pura.	83

Figura 42: Cromatograma do produto bruto obtido após a aplicação das condições de remoção do grupo nP pelo Método do Acetato de Amónio ao péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	85
Figura 43: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B' ($t_r=12.2$ minutos, ver Figura 41) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com acetato de amónio	86
Figura 44: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C' ($t_r=14,1$ minutos, ver Figura 41) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com acetato de amónio.	87
Figura 45: Cromatograma do produto bruto obtido para o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro após controlo de secagem. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	88
Figura 46: Cromatograma do produto bruto obtido após secagem do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro e posterior tratamento com acetato de amónio, com acerto do pH inicial ao valor de 7. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	89
Figura 47: Cromatograma do péptido TTI puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	90
Figura 48: Cromatograma do péptido $^{12}\text{sTyr-TTI}$ puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	92
Figura 49: Cromatograma do péptido $^9\text{sTyr-TTI}$ puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	92
Figura 50: Cromatograma do péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$ puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.	93

Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferentes resinas utilizadas em SPPS, usando esquema de proteção Fmoc/ ^t Bu.....	7
Tabela 2. Massa molar do segmento de 20 aminoácidos C-terminal do TTI, nas formas protegida e desprotegida.	46
Tabela 3. Adutos protonados do péptido 20AA, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).....	48
Tabela 4: Sequências e massas molares dos péptidos-alvo, na forma totalmente desprotegida e na forma contendo o(s) resíduo(s) de sTyr ainda protegido(s) com o grupo nP.	49
Tabela 5: Adutos protonados do péptido TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).....	50
Tabela 6: Adutos protonados do péptido ¹² sTyr(nP)-TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).	55
Tabela 7: Adutos protonados do péptido ⁹ sTyr(nP)-TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).	57
Tabela 8: Adutos protonados do péptido ^{9,12} sTyr(nP)-TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).	59
Tabela 9: Adutos protonados do péptido ¹² sTyr-TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).	62
Tabela 10: Adutos protonados do péptido ⁹ sTyr-TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).	63
Tabela 11. Condições experimentais testadas no estudo da remoção do grupo nP do péptido ^{9,12} sTyr(nP)-TTI, pelo método do acetato de amónio.	65
Tabela 12. Sequências peptídicas derivadas do hexapéptido DsYDEsYG e respetivas massas molares.....	70
Tabela 13: Adutos protonados do péptido ^{9,12} sTyr-TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).	82
Tabela 14: Adutos protonados de um derivado monossulfatado do TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).....	83
Tabela 15: Adutos protonados de um derivado monossulfatado do TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).....	86
Tabela 16: Resumo dos resultados experimentais obtidos para o péptido TTI e suas variantes sulfatadas.	93

Glossário

AA aminoácido

AcOH ácido acético

ACN acetonitrilo

ADN ácido desoxirribonucleico

All alilo

Azm azidometilo

Boc *tert*-butoxicarbonilo

Bzl benzilo

2-ClIt 2-clorotritilo

CAM *cell-surface adhesion molecules*

CCK-33 colescistoquinina 33

DBU 1,8-diazabicycloundec-7-eno

DCE 1,2-dicloroetano

DCM diclorometano

DCP dicetopiperazina

DCV diclorovinilo

DIEA *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina

DMAP 4-*N,N*-dimetilaminopiridina

DMF *N,N*-dimetilformamida

DMSO dimetilsulfóxido

EV71 enterovírus 71

Eq equivalente molar

Fmoc 9-fluorenilmetoxycarbonilo

Fmoc-Rink ácido *p*- α -[1-(9H-fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil]

fenoxiacético

G-34 gastrina 34

GP grupo protetor

GPCR *G-protein-coupled receptors*

HAT *Human African Trypanosoma*

HATU hexafluorofosfato de *O*-(7-aza-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

HBTU hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

HFIP hexafluoroisopropanol

HIV-1 *human immunodeficiency virus*

HOBt 1-hidroxibenzotriazol

HPLC cromatografia líquida de alta eficiência

iBu isobutilo

2-MI 2-metilimidazol

2-MP 2-metilpiperidina

m/z relação massa/carga

MAOS *microwave-assisted organic synthesis*

MBHA metilbenzidrilamina

MTBE éter *terc*-butilmetílico

mRNA ácido ribonucleico mensageiro

Msib *p*-(metilsulfinil)benzilo

Msz *p*-(metilsulfinil)benzoxycarbonilo

Mtb *p*-(metiltio)benzilo

Mtz *p*-(metiltio)benzoxycarbonilo

MW-SPPS *microwave-assisted solid-phase peptide synthesis*

NMM *N*-metilmorfolina

nP neopentilo

o-Nb *o*-nitrobenzilo

PA poliamida

PAL *Peptide Amide Linker*

PAP *3'-phosphoadenosine-5'-phosphate*

PAPS *3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate*

PEG polietilenoglicol

PS poliestireno

PSGL-1 *P-selectin glycoprotein ligand-1*

PTM *post-translational modification*

PyBOP hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfónio

PTS *protein tyrosine sulfation*

RP-MPLC cromatografia líquida de fase reversa de média pressão

Rpm rotações por minuto

SDM *site-directed mutagenesis*

S_N1 substituição nucleófila unimolecular

SO₃-DMF complexo trióxido de enxofre-*N,N*-dimetilformamida

SO₃-Pyr complexo trióxido de enxofre-piridina

SPPS *Solid-Phase Peptide Synthesis*

SPS *Solution Phase Synthesis*

sTyr sulfotirosina

TBAF fluoreto de tetrabutylamónio

TBS *terc*-butildimetilsililo

tBu *terc*-butilo

TBTU tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

TCE tricloroetilo

TEA trietilamina

TES trietilsilano

TIS triisopropilsilano

TFA ácido trifluoroacético

TFE 2,2,2-trifluoroetanol

TFMSA ácido trifluorometanossulfónico

THF tetrahidrofurano

t_r tempo de retenção

TTI *tsetse thrombin inhibitor*

TPST *tyrosyl protein sulfotransferase*

UV Ultravioleta

NOTA: foram utilizados os nomes e abreviaturas de aminoácidos codificados (ou proteinogénicos) recomendados pela IUPAC-IUB, de acordo com a informação disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/> (acedida a 11 de julho de 2015)

1. Introdução

Os péptidos e peptidomiméticos desempenham um papel crucial na investigação médica e farmacêutica. Assim, os péptidos têm recebido grande atenção ao longo dos anos, pois possuem uma vasta gama de propriedades biológicas, tais como antimicrobianas, anti-trombóticas, opiáceas, antioxidantes, entre outras. Por conseguinte, os péptidos começam a ser vistos como farmacóforos privilegiados no desenvolvimento de novos fármacos.

Normalmente, os péptidos endógenos existem em pequeníssimas quantidades nos organismos seus secretores, e o seu isolamento das matrizes biológicas onde se encontram nem sempre é simples. Assim, a produção de péptidos por extração das suas fontes naturais, quando possível, permite apenas obter quantidades mínimas de péptido puro que, ainda que porventura suficientes para identificação por técnicas avançadas de espetrometria de massa ou para avaliação de bioatividade *in vitro*, não são adequadas para a realização de estudos mais abrangentes e/ou complexos, desde uma caracterização completa ao nível estrutural (por ressonância magnética nuclear, cristalografia por difração de raios-X, entre outras técnicas) ou ao nível pré-clínico (perfil farmacocinético e farmacodinâmico completo), até à subsequente avaliação do péptido como potencial candidato a ensaios clínicos e posterior exploração farmacêutica [1]. Este obstáculo pode, em alguns casos, ser contornado pelo advento da tecnologia de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, permitindo expressar sequências peptídicas pré-definidas em sistemas bacterianos, como é o caso da produção de insulina humana recombinante por expressão do gene daquela proteína humana em bactérias *Escherichia coli*. Ainda assim, nem todos os péptidos e proteínas são facilmente produzidos por técnicas de ADN recombinante, pelo que o interesse da comunidade científica na exploração de péptidos com potencial terapêutico só teve grande expressão a partir da invenção de métodos robustos e eficazes de síntese química de péptidos. Os fundamentos metodológicos da síntese química de péptidos têm mais de 100 anos de história, sendo Emil Fischer o primeiro eminente cientista a reconhecer a necessidade de estabelecer métodos robustos e fiáveis de síntese peptídica [2]. Durante os primeiros dois terços do século XX, a síntese química de péptidos era, por excelência, realizada em solução. Ainda que a síntese peptídica em solução (SPS) proporcione o isolamento e caracterização dos produtos intermediários e permita um aumento da escala sintética genericamente simples e eficaz, nunca se tornou uma ferramenta competitiva para a produção de péptidos, dada a sua morosidade e baixo rendimento global. Foi apenas com a

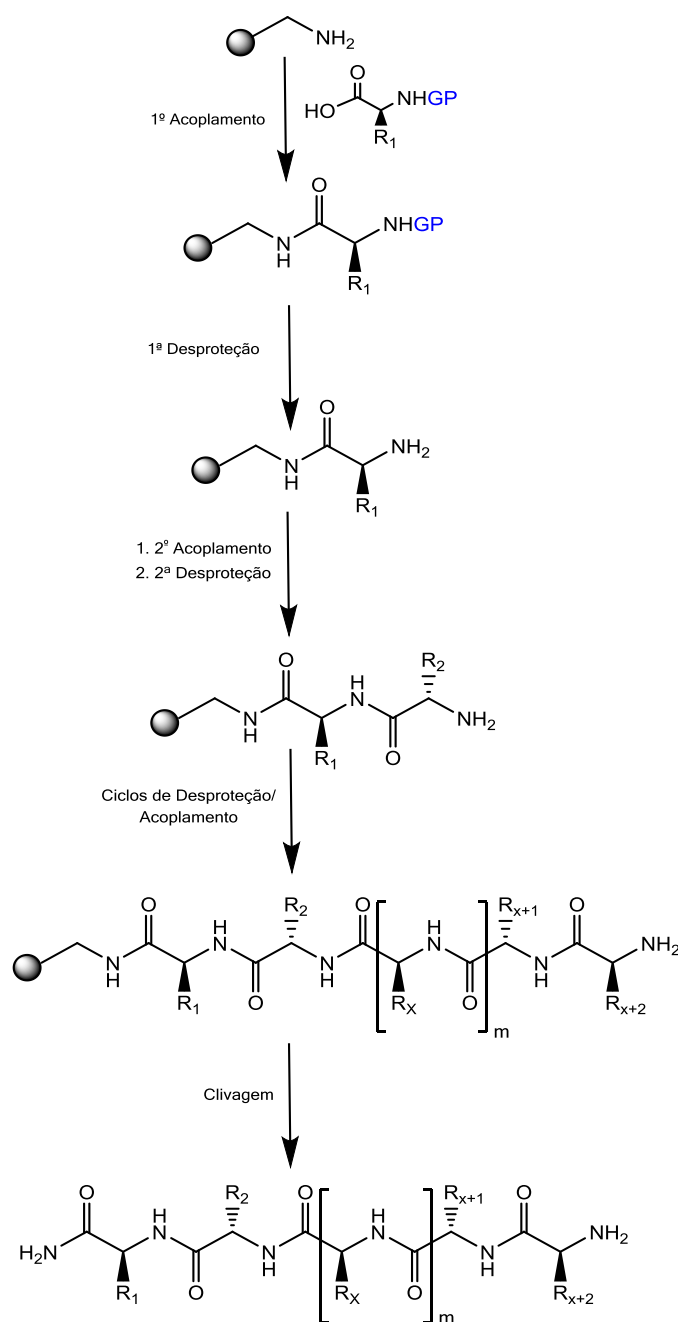
introdução da síntese peptídica em fase sólida (SPPS, do inglês *Solid Phase Peptide Synthesis*) em 1963, que a obtenção de péptidos por via estritamente química se conseguiu afirmar, representando uma verdadeira revolução em Química Peptídica. Hoje em dia, a SPPS é, por excelência, a via mais robusta, eficaz e popular de produção de péptidos. Apesar de ainda apresentar alguns problemas, em especial no que concerne à síntese de péptidos longos (com mais de 40 aminoácidos) e a produção em larga escala (escala multi-grama), a SPPS permite sintetizar péptidos naturais ou estruturas peptidomiméticas sem par na natureza, para as mais diversas aplicações [1,3].

1.1 Síntese de Péptidos em Fase Sólida

A SPPS foi introduzida nos anos 60 quando Robert Bruce Merrifield [4], formado em Química e especializado em Bioquímica, propôs uma forma simples e rápida de sintetizar péptidos bioativos por via exclusivamente química. A SPPS assenta num primeiro passo de ligação do aminoácido C-terminal do péptido-alvo a um suporte sólido insolúvel (“resina”), de modo que, uma vez formada a ligação covalente entre esse aminoácido e a resina, se consiga proceder à purificação (eliminação de excesso de reagentes e de produtos laterais) por simples lavagem com solventes adequados, seguida de filtração. Esse aminoácido deverá estar *N*-protegido, para garantir uma reação regiosseletiva, pelo que se deverá remover o grupo de *N*-proteção, uma vez ligado o aminoácido à resina. Após a reação de desproteção, repete-se a operação de lavagem com solventes e filtração. O aminoácido seguinte, também *N*-protegido, será incorporado de forma idêntica, e assim por diante, até que toda a cadeia peptídica tenha sido construída sobre a resina insolúvel.

Entre as vantagens da SPPS descritas por Merrifield, por comparação com a SPS, contam-se: rendimentos mais elevados, por se poder usar excesso de reagentes de forma a forçar a reação a ser completa; menor número de passos e manipulações experimentais, diminuindo substancialmente o tempo global da síntese; e minimização das perdas de material inerentes a etapas clássicas de isolamento e purificação de intermediários, inexistentes em SPPS [5]. Em suma, o princípio da SPPS é ilustrado pelo Esquema 1: o aminoácido C-terminal *N*^α-protegido (e também protegido lateralmente, se necessário) é ligado à resina na presença de agentes de acoplamento *in situ*, como carbodiimidas ou sais de urónio [6], seguindo-se a remoção do grupo *N*^α-protetor, permitindo o subsequente acoplamento do aminoácido *N*^α-protegido seguinte, e assim sucessivamente, fazendo-se crescer o péptido no sentido C-terminal→*N*-

terminal. O último passo de síntese consiste na clivagem da ligação péptido-resina, geralmente realizada por acidólise e acompanhada por remoção dos grupos protetores laterais dos aminoácidos. À mistura ácida usada para a clivagem, é usual adicionar-se agentes sequestradores de cátions (os *scavengers*), como tióis, trialquilsilanos e/ou água.



GP= Grupo Protetor

Esquema 1: Esquema geral de Síntese Peptídica em Fase Sólida.

1.1.1 Esquemas de proteção

A proteção de grupos funcionais é uma das questões mais importantes em síntese orgânica, não sendo a síntese peptídica uma exceção. Na química peptídica, é obrigatória a N^α -proteção do aminoácido cujo carboxilo vai ser ativado, para evitar a polimerização desse aminoácido. Ocorrendo a SPPS no sentido C-terminal \rightarrow N-terminal, como já foi referido, a proteção do grupo amino terá que ser assegurada pelos chamados grupos protetores temporários, que são removidos sempre que se completa um ciclo de acoplamento. Sendo tais remoções realizadas repetidas vezes durante a síntese, deverão ser possíveis em condições moderadas que não afetem os restantes grupos de proteção, a ligação péptido-resina e a própria estrutura peptídica. Aos grupos de proteção que têm de permanecer até ao final da construção da cadeia peptídica, geralmente usados nas cadeias laterais dos aminoácidos, dá-se o nome de grupos protetores permanentes. Estes são, geralmente, removidos no processo de clivagem da ligação péptido-resina, para obtenção do péptido final, totalmente desprotegido.

Idealmente, a SPPS deverá seguir em esquema de proteção ortogonal, ou seja, deverá assentar na combinação de grupos protetores temporários e permanentes que são respetivamente removíveis por agentes e mecanismos de remoção completamente diferentes. Na impossibilidade de tal ser aplicável a um dado caso concreto, recorre-se a um esquema de proteção seletiva, em que os grupos temporários e permanentes são removidos pelo mesmo tipo de agente e mecanismo reacional (por exemplo, acidólise), mas aos quais esses dois tipos de grupos apresentam labilidades marcadamente diferentes.

O primeiro esquema de proteção em SPPS, usado por Merrifield [4], foi o esquema de proteção seletiva Boc/Bzl, em que tanto o grupo temporário (*tert*-butoxicarbonilo, Boc) quanto os grupos permanentes (benzilo, Bzl, entre outros) são removidos por acidólise. No entanto, enquanto o Boc é removido com soluções de ácido trifluoroacético (TFA) a 30% em diclorometano (DCM), os grupos permanentes são resistentes a essas condições de acidólise, requerendo condições muito mais drásticas, como o uso de HF anidro ou ácido trifluorometanossulfónico (TFMSA). A não ortogonalidade e agressividade inerentes ao esquema Boc/Bzl justificam que este seja quase sempre preterido em favor do esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu [7], em que o grupo protetor temporário 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) [8] é removido por amins secundárias, como piperidina em *N,N*-dimetilformamida (DMF), e os grupos de proteção permanente são removidos por acidólise no decurso da

clivagem, normalmente usando 90 a 95% de TFA e trialquilsilanos e água como *scavengers* [9].

1.1.2 Suporte Sólido

O suporte sólido, em SPPS, não consiste apenas no polímero insolúvel sobre o qual o péptido será construído, sendo igualmente necessário considerar o espaçador que unirá esse polímero ao aminoácido C-terminal. O espaçador (muitas vezes designado como *linker* ou *handle*) é, normalmente, uma estrutura bifuncional que apresenta grupos reativos, quer para ligação covalente ao polímero devidamente funcionalizado, quer para ligação ao aminoácido C-terminal, por outro. Estas ligações têm que ser estáveis às condições químicas aplicadas no processo de alongamento da cadeia peptídica, mas lábeis às condições a aplicar na clivagem final. Existem várias combinações polímero-espaçador no mercado, disponíveis para escolha em função da aplicação em vista: síntese corrente, síntese envolvendo eventuais modificações da estrutura peptídica (sejam do carboxilo C-terminal, sejam modificações a introduzir nas cadeias laterais com o péptido ainda ancorado à resina), síntese de péptidos longos ou “difíceis”, entre outros casos específicos. Na gíria da SPPS, é comum o emprego do termo “resina” para designar tanto o polímero insolúvel de base, quanto o suporte sólido na globalidade, ou seja, o conjunto polímero + espaçador [10].

As resinas à base de poliestireno (PS) reticulado são as mais utilizadas em SPPS, apresentando boa expansão (“inchamento”) da rede polimérica em solventes trivialmente usados em SPPS, tais como a DMF ou o DCM, permitindo uma boa difusão dos reagentes pelo interior dos grânulos de polímero. A resina está sob a forma de grânulos, apresentando geralmente 38-75 µm de diâmetro (200-400 *mesh*) e ocasionalmente 70-150 µm de diâmetro (100-200 *mesh*), com graus de funcionalização entre 0,5 e 0,8 mmol [5]. No entanto, existem resinas com graus de funcionalização inferiores (0,1 ou 0,2 mmol/g), mais adequadas para a síntese de péptidos com mais de 25-30 aminoácidos ou de sequências ditas “difíceis” (com elevada propensão para o enovelamento ou para a agregação) [9].

Para aplicações em que se preveja a necessidade de usar solventes mais polares que o DCM ou a DMF, ou em que seja recomendada uma maior hidrofília do suporte sólido (síntese de péptidos longos e/ou “difíceis”), pode-se recorrer a resinas do tipo poliamida (PA), ou à base de polietilenoglicol (PEG), combinado ou não com poliestireno (no último caso, designadas PEG-PS). Estas resinas apresentam propriedades físicas distintas das resinas PS, tanto a nível microscópico como

macroscópico, tendo geralmente menor grau de funcionalização que as resinas PS mais correntes [10,11].

A construção da cadeia peptídica requer a utilização de resinas que mantenham os grupos protetores das cadeias laterais intactos mediante a desproteção ortogonal. Assim sendo, as resinas lábeis a ácidos são as preferidas, uma vez que a manipulação do passo de desproteção é mais simples.

Para a obtenção de péptidos que preservem os grupos protetores laterais e/ou apresentem determinadas modificações C-terminais, é mais comum usar-se a resina de cloreto de 2-clorotritilo (1, Figura 1), devido ao seu baixo custo e grande labilidade a ácidos. Sinteticamente, a resina de cloreto 2-clorotritilo [12] apresenta outras vantagens tais como: i) minimiza a formação da dicetopiperazinas (DCP) como resultado do impedimento estérico que o grupo tritilo impõe (o que pode ser um problema com sequências peptídicas que possuam prolinas ou glicinas C-terminais), ii) baixa taxa de racemização do aminoácido C-terminal, útil na incorporação de aminoácidos mais propensos à racemização, como a histidina ou a cisteína, iii) possibilidade de ser reciclada.

No caso mais geral, os péptidos produzidos por SPPS são obtidos na forma carboxamida em C-terminal. As resinas mais correntes para a síntese destes péptidos pelo esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu são as resinas Rink, PAL e Sieber (2 a 4, respetivamente, na Figura 1).

A resina Rink, ou Rink Amida, [13] é o suporte eleito para a síntese de carboxamidas primárias. A seguir à remoção do grupo Fmoc da resina Rink, o grupo amino ligado à resina pode ser acilado usando métodos correntes de condensação peptídica. O grupo amida resultante é estável a uma vasta gama de condições reacionais, mas pode ser facilmente clivado da resina por tratamento com uma solução de TFA a 95%. A labilidade ácida desta resina deve-se a dois grupos metoxilo, dadores de eletrões. Assim, esta resina tornou-se o suporte mais popular para as aplicações correntes de SPPS, mas existem outros suportes com propriedades semelhantes como a resina PAL [14], cuja labilidade a ácidos é superior à da Rink Amida, e a resina 9-xantenilo, vulgarmente conhecida como resina Sieber [15], que exhibe uma grande labilidade a ácidos, sendo possível proceder à clivagem sob condições muito suaves (TFA a 1-5%), como se ilustra na Tabela 1. Assim, a resina Sieber é adequada à síntese de péptidos na forma de carboxamida em C-terminal lateralmente protegidos.

Tabela 1: Diferentes resinas utilizadas em SPPS, usando esquema de proteção Fmoc/^tBu.

Resina	Forma mais usual do péptido clivado	Condições de clivagem
Cloreto de 2-Clorotritilo	<ul style="list-style-type: none"> • Carboxilo em C-terminal • Lateralmente protegido 	AcOH/TFE/DCM (1:1:8 v/v/v); HFIP/ DCM (1:4 v/v); 0,5 TFA/ DCM (v/v).
Rink Amida	<ul style="list-style-type: none"> • Carboxamida primária em C-terminal • Desprotegido 	95% TFA
PAL	<ul style="list-style-type: none"> • Carboxamida primária em C-terminal • Desprotegido 	90% TFA
Sieber	<ul style="list-style-type: none"> • Carboxamida primária em C-terminal • Lateralmente protegido 	TFA/DCE (2:98 v/v)

Normalmente, as resinas aminadas são fornecidas na forma *N*-Fmoc-protegida, pelo que se deve proceder à remoção do grupo Fmoc (desproteção), antes do início da síntese propriamente dita, por incorporação do aminoácido C-terminal [10].

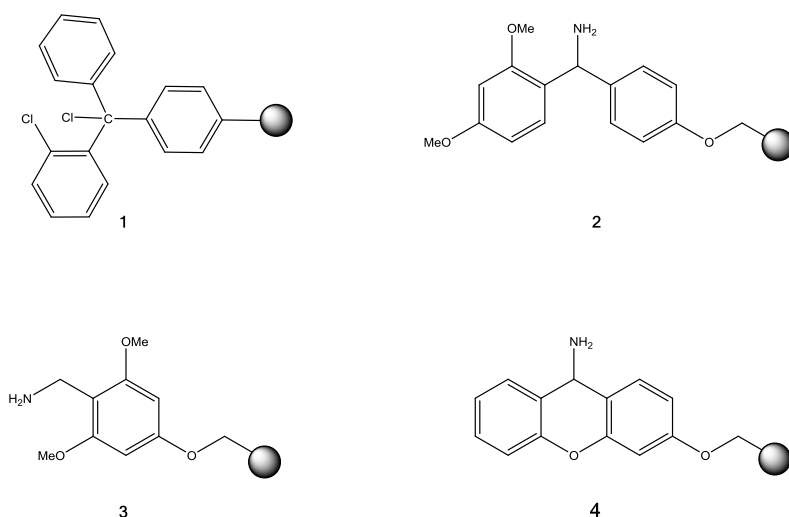


Figura 1: Resinas mais comuns para a síntese de peptidil-carboxamidas pelo método Fmoc/^tBu (estrutura molecular explícita apenas para o espaçador; polímero genérico representado por esfera cinzenta).

No âmbito desta Dissertação, foi usada uma das resinas mais correntes em SPPS, a resina Fmoc-Rink-MBHA (figura 2), que consiste num polímero de PS reticulado com 1% de divinilbenzeno e modificado com o grupo 4-metilbenzidrilamina, por sua vez ligado a um espaçador Fmoc-Rink [ácido *p*- α -[1-(9H-fluoren-9-il)metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil]fenoxiacético [7,16].

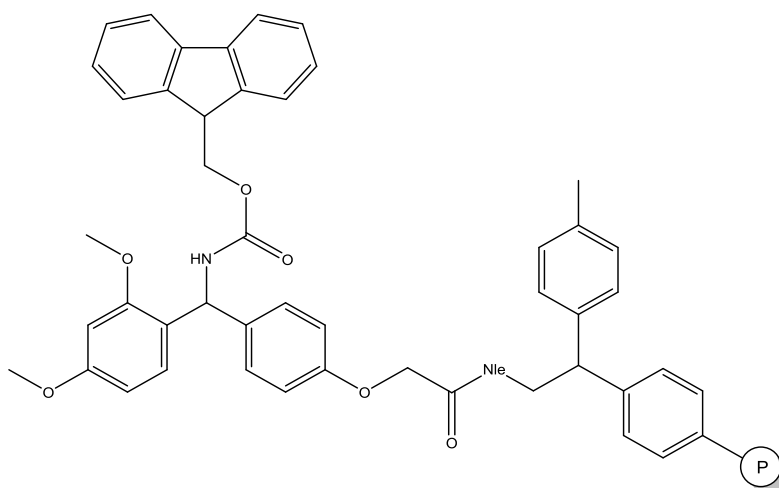
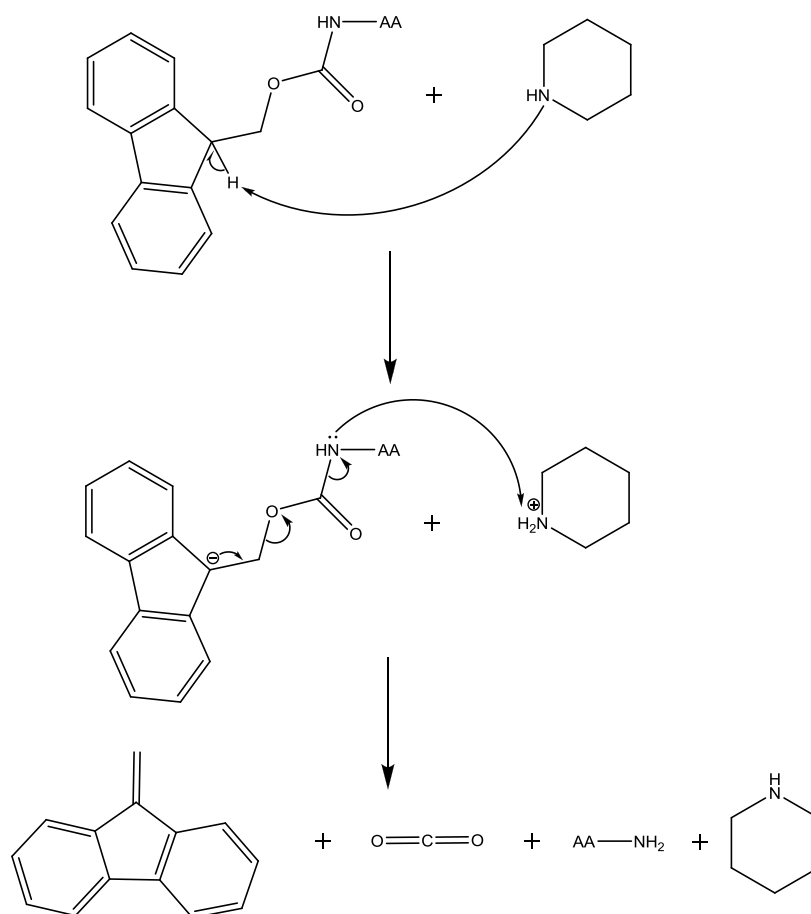


Figura 2: Estrutura da resina Fmoc-Rink Amida MBHA, onde o polímero de base se representa por P.

Assim, para se dar início ao processo de SPPS sobre este suporte sólido, é necessário começar por remover o grupo Fmoc, seguindo o protocolo corrente de tratamento com uma solução de piperidina a 20% em DMF [7]. O grupo Fmoc é, assim, removido via eliminação β seguida de descarboxilação espontânea, deixando o grupo amino primário livre para condensação com o aminoácido C-terminal do péptido a sintetizar (Esquema 2).

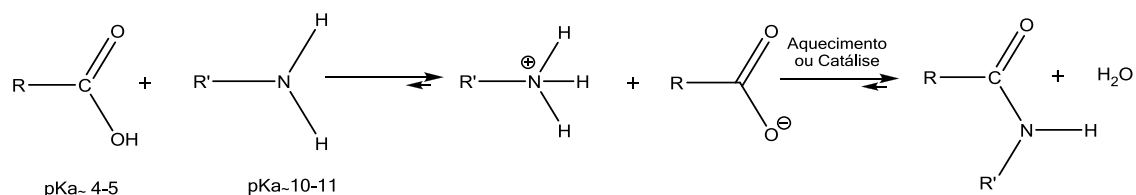


Esquema 2: Esquema reacional da remoção do grupo Fmoc com piperidina

1.1.3 Condensação *in situ* mediada por sais de urónio

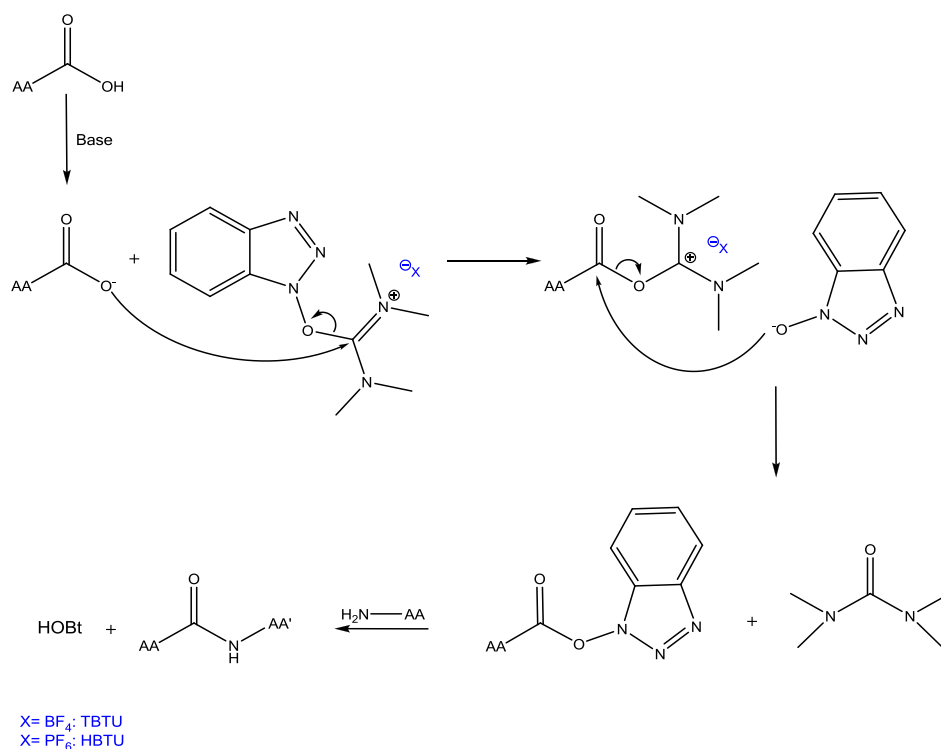
Na natureza, a síntese ribossómica (biossíntese) de péptidos e proteínas envolve, tal como em SPPS, o acoplamento sequencial de aminoácidos; no entanto, a biossíntese peptídica ocorre no sentido *N*-terminal→*C*-terminal, requerendo uma maquinaria enzimática muito complexa e bem articulada, provavelmente para salvaguardar a sequência de aminoácidos única e bem definida de cada péptido ou proteína endógena. No entanto, a síntese de péptidos por via estritamente química não pode tirar partido da seletividade, especificidade e catálise das biomoléculas envolvidas na biossíntese proteica. Desde logo, a formação de uma ligação peptídica (amida) entre o grupo carboxilo de um interveniente e o grupo amino do outro não ocorre à temperatura ambiente. Nestas condições, é cineticamente favorecida a formação de um sal (carboxilato de amónio), sendo necessário aplicar temperaturas muito elevadas para que o processo favorecido termodinamicamente, ou seja, a

formação da amida, tenha lugar (Esquema 3). Tais temperaturas são geralmente incompatíveis com a síntese de péptidos de forma a preservar as suas características físico-químicas e biológicas [17].



Esquema 3: Esquema de reação da formação da ligação amida [adaptado da ref.17].

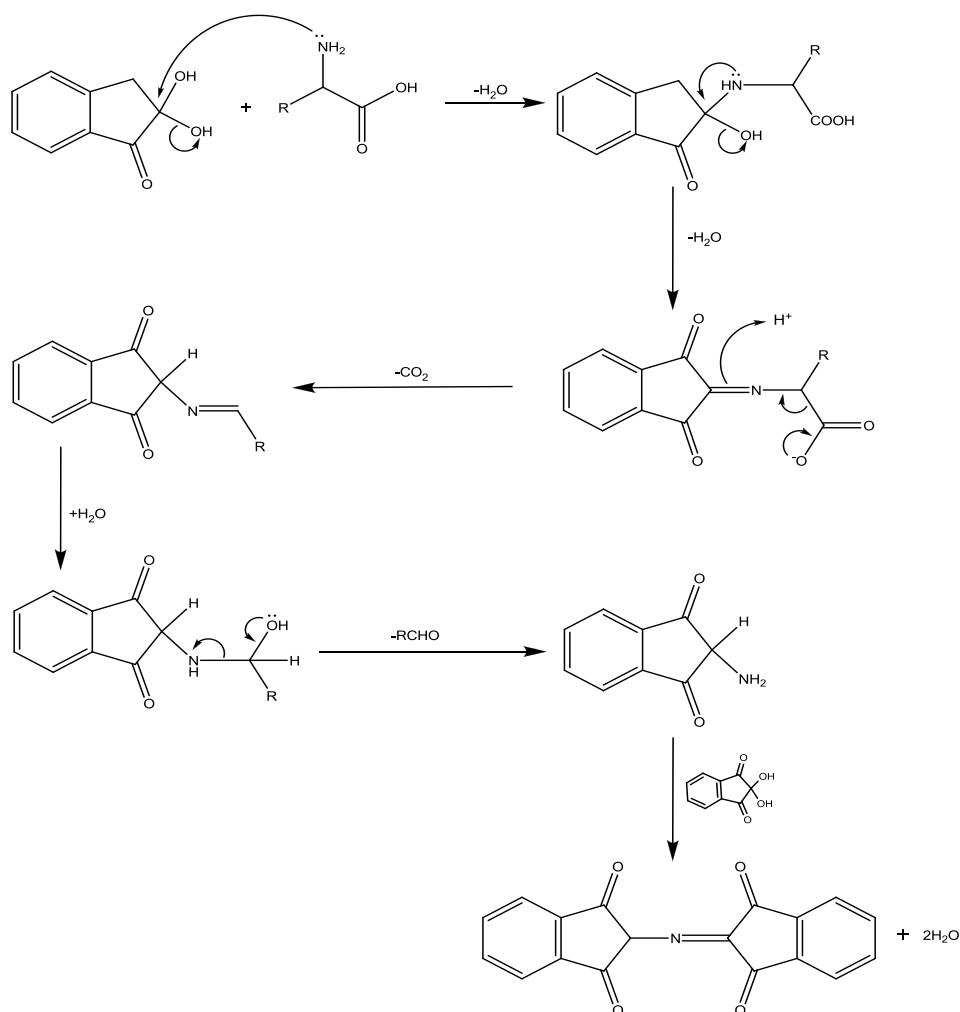
Alternativamente, a formação da ligação amida pode promover-se substituindo o componente carboxílico por um seu derivado reativo. O uso de derivados carboxílicos reativos clássicos, como halogenetos de alcanoílo, não é aconselhado em síntese peptídica, devido a problemas de epimerização dos aminoácidos ativados. No entanto, têm sido desenvolvidos agentes de acoplamento que promovem *in situ* a conversão do componente carboxilo num éster ativado sem ocorrência significativa de epimerização. Entre os mais populares desses agentes, incluem-se os sais de urónio (Esquema 4) como o hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)- N,N,N',N' -tetrametilurónio (HBTU) ou o tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)- N,N,N',N' -tetrametilurónio (TBTU), que diferem apenas no contra-íão, o que não parece ter qualquer influência sobre a reatividade, no entanto apresentam solubilidades diferentes [6]. Análogos mais eficientes, como o hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)- N,N,N',N' -tetrametilurónio (HATU), são usados em acoplamentos envolvendo aminoácidos estericamente impedidos ou cujo grupo amino tem fraco carácter nucleofílico, já que promove a formação de ésteres de 7-azabenzotriazol-1-ilo, altamente reativos face a aminas, eventualmente devido a catálise geral básica intramolecular [6,17].



Esquema 4: Esquema reacional da ativação do componente carboxilo com um sal de urónio (TBTU ou HBTU) [adaptado da ref.17].

1.1.4 Teste de Kaiser

Como já foi referido, no decurso de uma SPPS não se procede ao isolamento, purificação ou identificação de intermediários de síntese, pelo que o eventual sucesso desta só pode ser definitivamente comprovado após clivagem e análise do péptido final. No entanto, existem testes colorimétricos que permitem ter uma ideia qualitativa do eventual sucesso de cada passo de síntese, sendo o mais corrente o chamado teste da ninidrina, ou teste de Kaiser [18]. Este teste permite detetar, com grande sensibilidade, a presença de grupos amino primários numa amostra, de acordo com o Esquema 5, onde a ninidrina (2,2-diidroxi-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona, de cor amarela) reage com o grupo α -amino de uma peptidil-resina, para formar um aduto de cor azul escura, conhecido por “púrpura de Ruhemann”. Assim, após desproteção, o teste de ninidrina deverá ser positivo (surgimento de cor azul intensa), ao passo que após o acoplamento de um aminoácido *N*-protegido, o teste da ninidrina deverá ser negativo (permanência da coloração amarela). Quando o resultado esperado para dada etapa da SPPS não se observar, dever-se-á repetir essa etapa as vezes necessárias (com eventuais alterações experimentais, ao nível dos reagentes ou concentrações a usar) para que o teste resulte como previsto [1,9].



Esquema 5: Esquema de formação do "púrpura de Ruhemann" por reação da ninidrina e o grupo amino primário de um α -aminoácido [1].

1.1.5 Síntese peptídica assistida por micro-ondas

A síntese peptídica em fase sólida tornou-se a principal fonte de péptidos sintéticos que são essenciais para estudos em biologia, biomedicina, conceção racional de fármacos, entre outros campos. Fizeram-se aperfeiçoamentos, ao longo das últimas três décadas, relativamente a grupos protetores de aminoácidos, agentes de acoplamento e resinas, de modo a que as sínteses de rotina sejam mais simples e eficientes. Esta simplicidade no processo de síntese, em conjunto com o caráter repetitivo dos ciclos de acoplamento e desproteção e com a evolução da informática, fizeram com que se desenvolvesse instrumentação para SPPS automatizada. Bruce Merrifield descreveu a primeira síntese química de um péptido por via automatizada em 1965, onde a síntese foi realizada numa vaso reacional, colocado num

compartimento equipado com sistema hidráulico, com a finalidade de bombeamento, contendo ainda reservatórios para todos os reagentes, aminoácidos, solventes e agentes de acoplamento, assegurando, deste modo, a entrega adequada dos mesmos, de acordo com programa informático pré-definido pelo operador [19]. Até aos dias de hoje, foi já percorrido um longo caminho de evolução dos sintetizadores automatizados de péptidos, sendo os sistemas atualmente disponíveis caracterizados por um elevado grau de fiabilidade e reprodutibilidade.

Durante as últimas décadas, o interesse crescente no campo da síntese orgânica assistida por micro-ondas (MAOS, do inglês *microwave-assisted organic synthesis*) fez com que, em 1992, Zu introduzisse o uso de micro-ondas na síntese peptídica (MW-SPPS), estimulando uma série de esforços de modo a superar as dificuldades encontradas nas sínteses convencionais tais como reações lentas, rendimentos baixos e produtos brutos complexos, difíceis de purificar. Um dos grandes problemas da SPPS convencional reside no facto de o péptido ter tendência a agregar-se à medida que se faz o alongamento da cadeia, através de interações intermoleculares. Este tipo de interações também pode ocorrer ao nível intramolecular, provocando o enrolamento da cadeia peptídica e, assim, baixando o rendimento da síntese [21]. Estes inconvenientes podem ser minimizados por aquecimento com micro-ondas nos ciclos de acoplamento e desproteção, tornando a síntese mais rápida e eficaz. No entanto, a resistência ao aquecimento é influenciada por solventes e reagentes, o que requer uma otimização da potência de irradiação e temperatura máxima a atingir, de modo a evitar a racemização e reações laterais, garantindo em simultâneo o sucesso do passo reacional [23]. Atualmente, existem sistemas já dotados de programas pré-definidos que permitem combinar eficazmente a SPPS com a MAOS, como é o caso do Liberty1 da CEM (Figura 3), disponível no nosso laboratório [20]. O uso deste tipo de sistemas permite o acesso a péptidos com sequências complexas dificilmente acessíveis via SPPS convencional, como é o caso da β -amilóide humana (1-42), altamente propensa à agregação [20,22].

Na maioria dos estudos descritos na literatura sobre MW-SPPS, utiliza-se a estratégia de proteção Fmoc/tBu, devido ao facto de ser demasiado dispendioso compatibilizar o equipamento com os tratamentos repetitivos com TFA usados no esquema Boc/Bzl. O desempenho de todos os reagentes de acoplamento mais usados em Fmoc/tBu SPPS foi estudado nas condições habituais de MW-SPPS, concluindo-se que a esmagadora maioria é perfeitamente estável a tais condições; excetua-se o caso do nucleófilo auxiliar "Oxyma", usado por vezes em alternativa ao HOBt, cuja estabilidade ao aquecimento foi reportada como sendo mais baixa que o desejável [24].

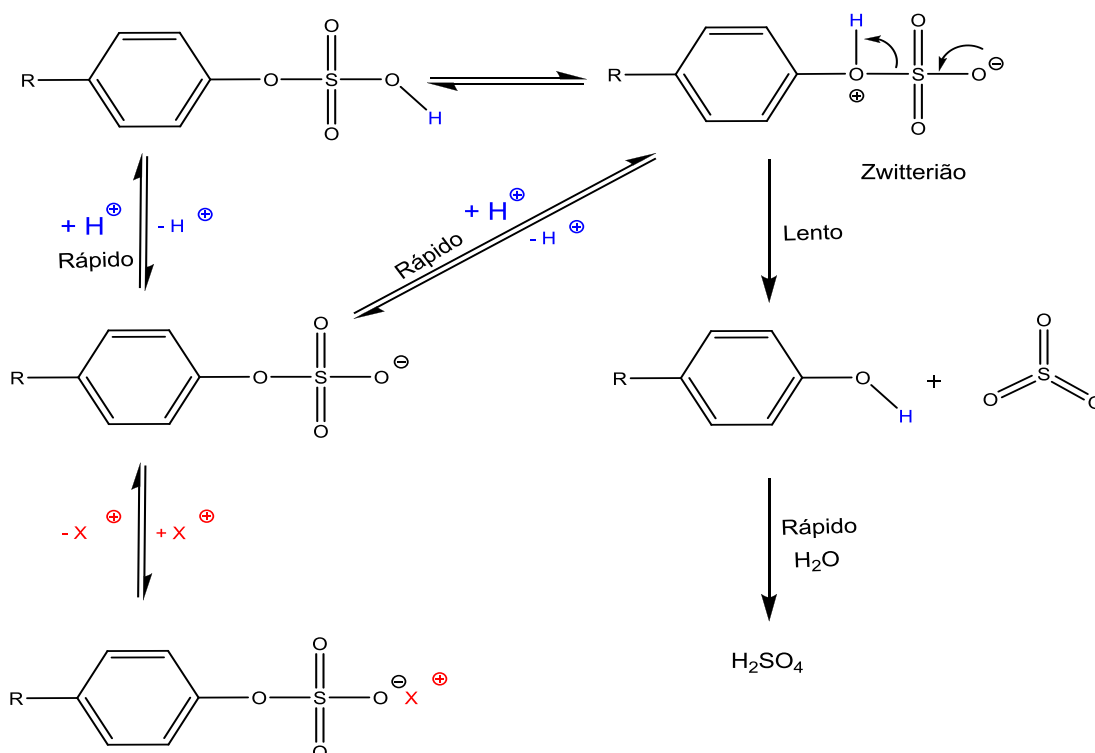


Figura 3: Sintetizador automático utilizado em MW-SPPS (CEM Liberty 1).

Apesar do grande avanço representado pela MW-SPPS, ainda não foi possível encontrar um desempenho universalmente ótimo, sendo ainda necessário fazer o ajuste dos parâmetros experimentais em função da sequência peptídica a sintetizar, pois a irradiação por micro-ondas pode facilitar processos indesejados, tais como a epimerização ou a formação da aspartimida, o que exige ter especial atenção quando estão presentes na sequência resíduo de cisteína, histidina ou ácido aspártico [24-26]. Por outro lado, não há garantia *a priori* que determinado aminoácido modificado, ou outro tipo de modificação que se deseje incorporar no péptido durante o alongamento da cadeia, seja compatível com a irradiação por micro-ondas. Assim, apesar de terem sido feitos progressos notáveis em SPPS, desde a sua invenção por Merrifield há mais de 50 anos [4], novas tecnologias robustas de síntese automatizada são necessárias.

1.2 Síntese de sulfo-péptidos em fase sólida

Alguns dos desafios atuais da SPPS, para além da síntese de péptidos longos ou de sequências “difíceis”, incluem a síntese de péptidos modificados, seja para produção de peptidomiméticos, seja para funcionalização com estruturas não peptídicas, seja ainda para mimetização de modificações pós-tradução (PTM, *post-translational modifications*) que ocorrem em proteínas e péptidos endógenos. Um exemplo dessas PTM é o da sulfatação do fenol lateral do aminoácido tirosina, cujas funções biológicas parecem ser diversas (ver ponto 1.4), mas ainda não estão completamente elucidadas. Estudos detalhados sobre as funções biológicas da O-sulfatação da tirosina são prejudicados pela dificuldade ao acesso a quantidades suficientes de sulfopéptidos e sulfoproteínas com elevado grau de pureza [27]. Tal poderá ser, eventualmente, resolvido por recurso à síntese química, mas esta terá que ser suficientemente robusta para contornar um dos problemas inerentes à sulfo-tirosina (sTyr), que é a sua reconhecida tendência para dessulfatar rapidamente em condições acídicas, para pH superior a 3 (Esquema 6) [28]. Esta questão da estabilidade dos resíduos de sTyr não põe em causa a funcionalidade biológica das proteínas sulfatadas, visto que a sTyr é estabilizada na forma aniónica de sulfato, quando convenientemente combinada com catiões presentes nas matrizes biológicas ou na própria proteína (ligação iónica entre as cadeias laterais da sTyr e dos resíduos de aminoácidos básicos, como Arg ou Lys); sabe-se que, quando convenientemente conjugada com catiões adequados, os resíduos de sTyr tornam-se estáveis não só em meio ácido com também em fase gasosa [29]. Isto explica o facto da taxa de hidrólise da sTyr depender mais da estrutura primária (sequência de aminoácidos) do que do comprimento da cadeia peptídica, bem como o facto de tal taxa ser normalmente superior em péptidos deficientes ou desprovidos de aminoácidos básicos [28].



Esquema 6: Hidrólise da tirosina sulfatada (via do lado direito) e estabilização por contra-íão X^+ (via do lado esquerdo) da cadeia lateral de resíduo de sulfotirosina (fenol O-sulfatado) [28,29].

A síntese química continua a ser um meio essencial para alcançar o local específico de incorporação dos resíduos de sTyr em péptidos. Os métodos sintéticos disponíveis seguem duas abordagens principais: sulfatação química de resíduos de tirosina após a montagem da cadeia peptídica ou a incorporação dos resíduos sulfatados de tirosina convenientemente protegidos no decurso da síntese peptídica. Ambas as abordagens assentam em síntese de péptidos em fase sólida (SPPS), de acordo com esquema de proteção Fmoc/ t Bu [8].

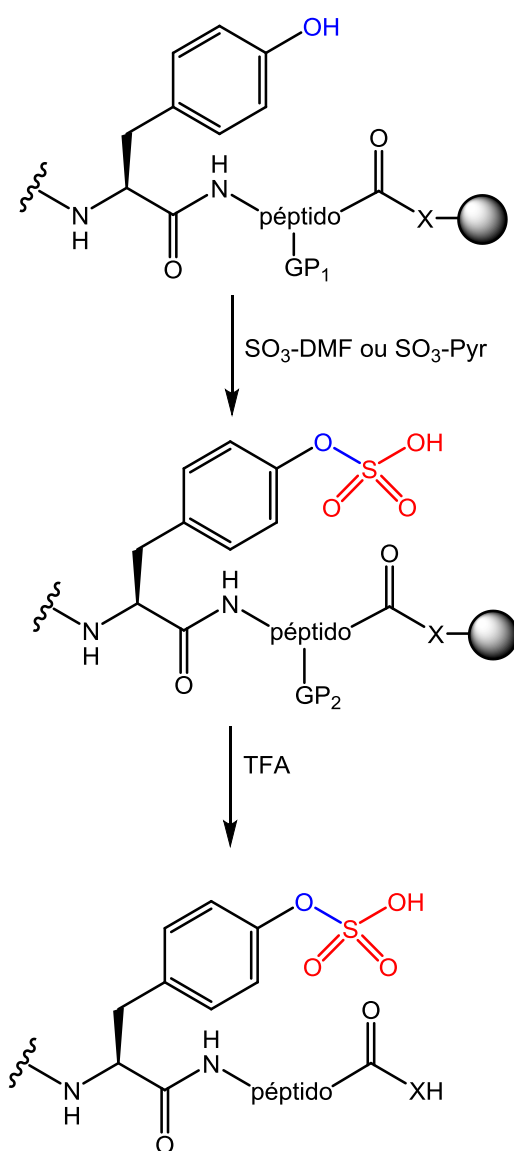
1.2.1 Sulfatação química após construção da cadeia peptídica

A sulfatação química da tirosina pode ser efetuada “*on-resin*”, ou seja, depois da cadeia peptídica estar construída na totalidade, mas ainda ancorada ao suporte sólido. Esta abordagem requer o uso de grupos protetores específicos para as cadeias laterais da tirosina, permitindo a desproteção ortogonal do grupo fenólico da(s) tirosina(s) a sulfatar e subsequente reação de sulfatação. Por sua vez, os grupos protetores de cadeias laterais de outros resíduos de aminoácidos devem ser estáveis às condições de sulfatação química empregues, que na maior parte dos casos envolvem o uso de complexos (ou adutos) de trióxido de enxofre com *N,N*-dimetilformamida (SO₃-DMF) ou com piridina (SO₃-Pyr) (Esquema 7) [30,31].

A utilização de complexos de trióxido de enxofre para sulfatação “*on-resin*” poderá conduzir à formação de derivados do ácido sulfâmico, se existirem grupos amino livres, os quais podem resultar de remoção prematura de grupos amino-protetores lábeis a ácidos, em consequência do uso de H₂SO₄ na produção *in situ* dos complexos de SO₃. A formação dos ácidos sulfâmicos pode ser evitada mediante proteção adequada dos grupos amino com grupos protetores lábeis a bases, tais como o grupo acetilo, o grupo Fmoc ou o grupo *p*-(metilsulfinil)benzoxicarbonilo (Msz) [31-34].

A sulfatação química ocorre preferencialmente nos grupos hidroxilo alcoólicos presentes nas cadeias laterais da serina, treonina e hidroxiprolina, em detrimento dos grupos hidroxilo fenólicos dos resíduos de tirosina. Além disso, na presença de resíduos de cisteína, é observada a formação de tiosulfato de cisteína. O recurso a estratégias ortogonais de proteção é a abordagem mais geral para garantir que a sulfatação ocorra apenas nos resíduos desejados. Neste sentido, Futaki *et al.* propuseram o uso do grupo *p*-(metilsulfinil)benzilo (Msib) para proteger cadeias laterais hidroxiladas que não se pretenda sulfatar, bem como do grupo Msz para proteção de grupos amino, como o grupo *N*-α-amino do aminoácido *N*-terminal ou o grupo ε-amino da cadeia lateral de resíduos de lisina [33,34]. Ambos os grupos, Msib e Msz, são estáveis ao TFA, pelo que não seriam removidos durante a etapa de clivagem e desproteção total da peptidil-resina; porém, a reação de sulfatação reduz o Msib e o Msz a *p*-(metilsulfanil)benzilo (Mtb) e *p*-(metilsulfanil)benzoxicarbonilo (Mtz), respetivamente, os quais são lábeis ao TFA, podendo ser removidos em condições que favoreçam a desproteção em detrimento da hidrólise dos resíduos de sTyr existentes [34].

Infelizmente, a sulfatação “*on-resin*” foi muitas vezes descrita como uma reação bastante incompleta, especialmente quando se visa a sulfatação de vários resíduos de tirosina num mesmo péptido grande. Para além disso, esta metodologia pode ser morosa e complexa, especialmente quando vários aminoácidos trifuncionais estão presentes, requerendo uma estratégia específica de proteção ortogonal. Assim, a sulfatação “*on-resin*” é potencialmente interessante apenas quando aplicada a pequenos péptidos, ou como alternativa à incorporação direta de resíduos de sTyr (ver 1.2.2), quando esta dá resultados insatisfatórios [35].

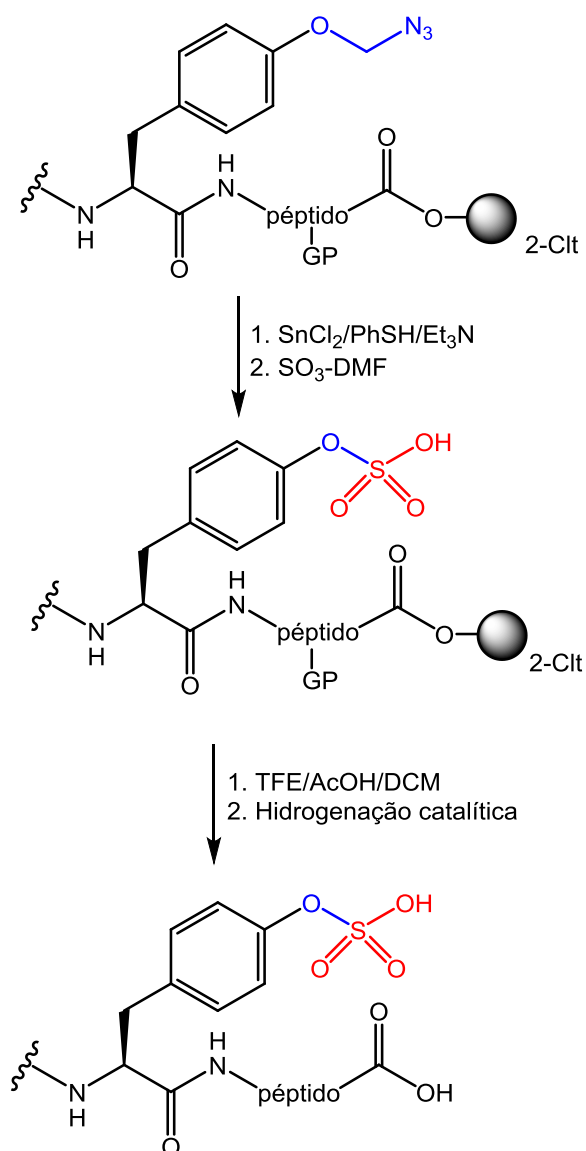


GP₁= Msib ou Msz

GP₂= Mtb ou Mtz

Esquema 7: Sulfatação “*on resin*” de uma tirosina seletivamente desprotegida por reação com SO₃-DMF ou complexos de SO₃-Pyr. Os grupos protetores (GP) noutros aminoácidos sensíveis são o Msib (proteção de grupos hidroxilo) ou o Msz (proteção de grupos amino). X= -O- ou -NH- para síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido da ref. 35].

Para melhorar a eficácia da sulfatação “*on resin*” com $\text{SO}_3\text{-DMF}$ ou $\text{SO}_3\text{-Pyr}$, *Young* e *Kiessling* usaram outros grupos protetores estáveis a ácidos, como o grupo azidometilo (Azm) [36], para proteger seletivamente o grupo fenol dos resíduos de tirosina a serem sulfatados. Nesta estratégia, tais resíduos de Tyr são incorporados na cadeia peptídica sob a forma de Fmoc-Tyr(Azm)-OH, seguindo-se a remoção ortogonal do grupo Azm por redução com cloreto de estanho (II), na presença de tiofenol e trietilamina. As condições utilizadas para redução homogênea do Azm são razoavelmente compatíveis com os procedimentos correntes de SPPS segundo o esquema Fmoc/ ^tBu , sendo preferível a aplicação de resinas lábeis a ácidos tal como a resina de cloreto de 2-clorotritilo (2-ClT) que requer condições de clivagem muito suaves para não favorecer a degradação dos monoésteres de sulfato formados. A aplicação do grupo Azm para proteger seletivamente resíduos de tirosina a sulfatar exige o uso do grupo benzilo (Bzl) para a proteção de outras tirosinas, requerendo um procedimento de clivagem/desproteção em duas etapas, visto que os grupos benzilo não são removidos com a clivagem suave da resina 2-ClT que utiliza um cocktail com trifluoroetanol (TFE) e ácido acético (AcOH) em diclorometano (DCM); consequentemente, os grupos Bzl são depois clivados por hidrogenação catalítica (Esquema 8) [36].



Esquema 8: Via geral de síntese de um péptido sulfatado por SPPS usando Fmoc/^tBu e resina 2-Clt, com incorporação dos resíduos de tirosina a serem seletivamente sulfatados ortogonalmente O-protegidos com o grupo Azm; os resíduos de tirosina que não se pretenda sulfatar deverão ser O-protegidos com o grupo Bzl, que requer um processo de clivagem em duas etapas [reproduzido da ref. 36].

Para testar esta metodologia, Taylor *et al.* sintetizaram uma sequência derivada da PSGL-1, uma glicoproteína sulfatada. Assim, e também para demonstrar a flexibilidade da estratégia, sintetizaram um octapéptido totalmente sulfatado (três tirosinas) e um octapéptido monossulfatado.

Após a construção da cadeia peptídica, remoção ortogonal do Azm, sulfatação, clivagem e todas as operações pós-clivagem (remoção do grupo Bzl, isolamento e purificação dos produtos peptídicos), o octapéptido trissulfatado foi isolado com 27% de rendimento, ao passo que a síntese do octapéptido monossulfatado foi um pouco

menos eficiente, possivelmente em consequência da etapa de remoção redutiva do Azm. Portanto, ainda que estes resultados demonstrem que é possível obter os péptidos sulfatados desejados por esta via, também evidenciam a sua limitada eficácia [36]. Para além disso, a síntese do Fmoc-Tyr(Azm)-OH é um processo com múltiplos passos e baixo rendimento global [36,37].

1.2.2 Incorporação direta de resíduos de sulfotirosina no péptido em crescimento

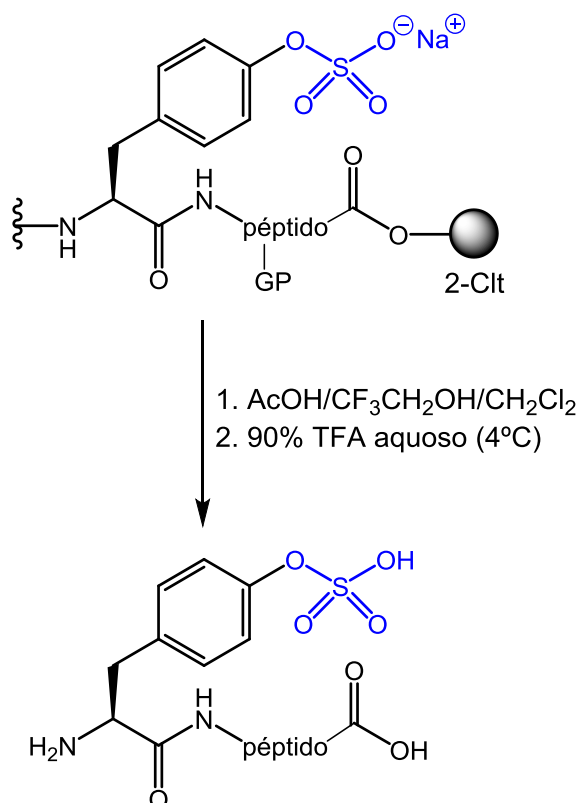
Os problemas frequentemente associados à sulfatação seletiva “*on resin*” dos resíduos de tirosina podem, em princípio, ser contornados por incorporação direta de resíduos de tirosina O-sulfatados durante a construção do sulfopéptido em fase sólida. As vantagens de tal abordagem são evidentes, não só porque a incorporação direta de resíduos de sTyr no decurso da SPPS evita todos os procedimentos específicos da sulfatação “*on resin*” (ver 1.2.1), mas também porque permite a instalação dos resíduos de sTyr nas posições pré-definidas pelo operador; consequentemente, torna-se possível o recurso a síntese automatizada [26].

Os sais de sódio ou de tetra-alquilamónio de tirosinas O-sulfatadas (e *N*^F-Fmoc protegidas) foram os primeiros a utilizar neste tipo de abordagem à síntese em fase sólida de sulfo-péptidos, a que se seguiram outros tipos de proteção lateral para a sTyr que têm vindo a ser explorados com sucesso. No entanto, como já foi referido e ilustrado no esquema 6, a principal dificuldade da incorporação direta de resíduos de sTyr reside na instabilidade destes em meio ácido, o que exige a adaptação das condições usadas vulgarmente nos passos de clivagem final e desproteção das cadeias laterais [20]. Assim, a clivagem/desproteção total do sulfo-péptido final, ainda que igualmente realizada por tratamento com TFA concentrado, deve ser levada a cabo em condições que favoreçam as reações desejadas em detrimento da hidrólise do grupo sulfato da sTyr, o que pode ser conseguido por acidólise a baixa temperatura (0-5°C) e na ausência de *scavengers* contendo enxofre, como o tioanisole ou o etano-1,2-ditiol, que tendem a acelerar a dessulfatação da tirosina [38-40].

a) Uso de sais de sódio e tetra-alquilamónio para proteção lateral de sTyr

A síntese eficiente de sulfopéptidos, usando sais de sódio ou tetra-alquilamónio de sulfotirosinas *N*^F-Fmoc-protegidas, assenta em dois fatores cruciais: (i) utilização da

resina 2-Clt, altamente lábil a ácidos, e (ii) clivagem/desproteção bi-etápica, clivando-se primeiro o péptido protegido usando TFE/AcOH/DCM, ao que se segue a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais usando TFA concentrado a baixa temperatura (Esquema 9) [39].



Esquema 9: Esquema de desproteção e clivagem final de sulfopéptidos em resina 2-Clt por incorporação seletiva de Fmoc-Tyr(SO₃⁻Na⁺)-OH [reproduzido da ref. 39].

Esta metodologia foi abordada por Kitagawa *et al.*, que quiseram testar a sua eficácia na síntese de péptidos longos e complicados contendo sTyr: gastrina II (G-34 (II), com 34 aminoácidos), e colecistoquinina-33 (CCK-33, com 33 aminoácidos). Estes autores incorporaram todos os aminoácidos, incluindo a sTyr protegida, através de acoplamentos de 90 minutos a 20 °C, usando 3 equivalentes molares (eq) de hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfónio (PyBOP) como agente de acoplamento *in situ*, 3 eq. de cada aminoácido *N*^º-Fmoc-protégido (Fmoc-AA-OH) e 9 eq. de *N*-metilmorfolina (NMM); a peptidil-resina obtida foi depois submetida ao primeiro passo de clivagem usando uma mistura de TFE/AcOH/DCM (1:1:3 v/v) durante 45 minutos a 25 °C, seguindo-se a acidólise com TFA a 90% em água, durante 5 horas a 4°C. Ambos os péptidos foram obtidos sem dificuldade após purificação por HPLC, mas apenas se logrou atingir um rendimento de 10% na síntese

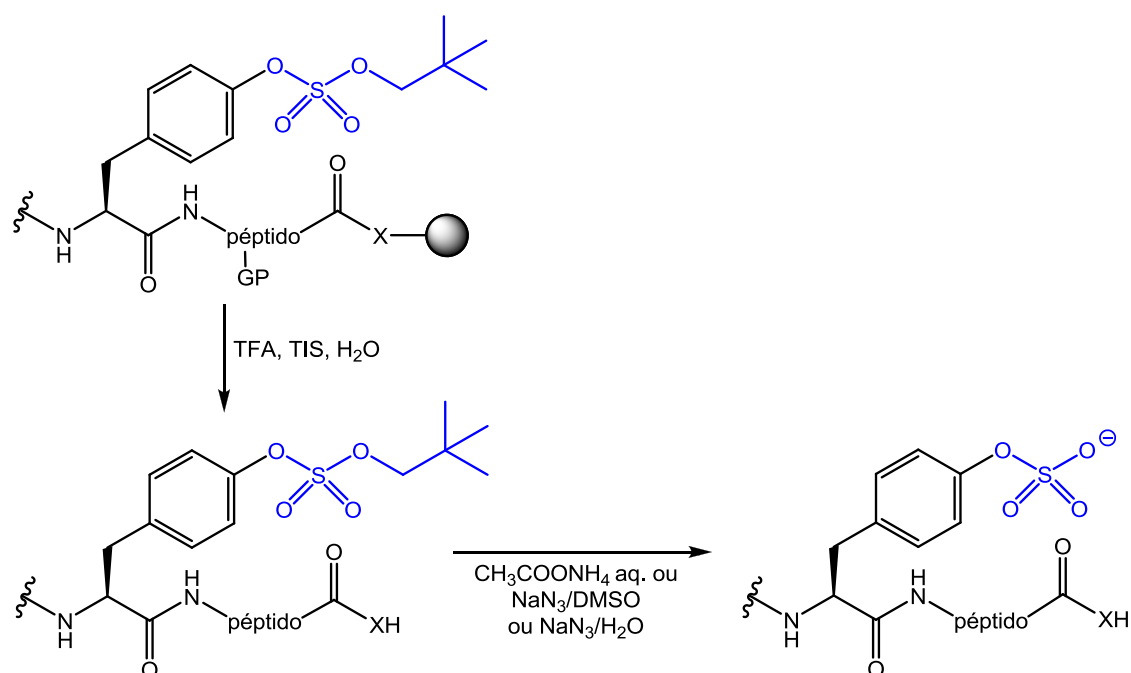
do CCK-33, o que foi atribuído à presença, neste péptido, de três resíduos de metionina, sensíveis à oxidação [38].

Apesar de ser afetado por reações incompletas nas etapas de clivagem e desproteção total, o método de incorporação direta de sais de sódio ou tetraalquilamónio de sTyr *N*^ε-Fmoc-protégida logo se tornou uma das vias preferidas de síntese de sulfopéptidos em fase sólida, pois – de uma forma geral – proporciona a obtenção de produtos com rendimentos e purezas mais altos do que os conseguidos pela sulfatação “*on resin*” descrita na secção anterior [38-40].

b) Uso do grupo neopentilo para proteção lateral de sTyr

Mais recentemente, Simpson *et al.* demonstraram que o uso do grupo neopentilo (nP), como protetor da cadeia lateral de resíduos de sTyr, permite efetuar a clivagem e desproteção total do sulfopéptido usando TFA concentrado, com degradação mínima do O-sulfato nP-protégido (Esquema 10); ainda que os sulfo-ésteres neopentílicos sejam prontamente clivados na presença de pequenos nucleófilos fortes, tais como azidas ou nitrilos, normalmente apresentam-se estáveis a ácidos e bases fortes, incluindo a piperidina utilizada para a remoção do grupo Fmoc e ao TFA usado na clivagem [41]. Deste modo, tem sido possível a síntese de sulfopéptidos, com rendimentos satisfatórios, usando resinas mais correntes, como as resinas Rink-Amida, que são muito menos sensíveis à humidade e quantidades vestigiais de ácidos do que as resinas 2-Clt. Após a clivagem da peptidil-resina com TFA concentrado, o grupo nP pode ser removido em condições como, por exemplo: tratamento com solução aquosa de acetato de amónio a 2 M, a 37 °C, durante 18 horas; reação com azida sódica (10 eq) em dimetilsulfóxido (DMSO) a 50 °C, durante 18 horas [42]; ou reação com azida sódica (50 eq) em água Milli-Q (1 mg mL⁻¹) a 70 °C, durante 18 horas [43].

Atualmente, o uso de Fmoc-Tyr(OSO₃nP)-OH é o método mais popular, pela sua simplicidade e relativo sucesso, para a síntese de sulfopéptidos. Ainda assim, face a relatos descrevendo o grupo nP como extremamente estável e de difícil remoção, requerendo altas temperaturas e longos tempos de reação, tem vindo a ser sugerida a sua substituição pelo grupo isobutilo (ⁱBu), mais sensível a bases e nucleófilos [44]. Contudo, o uso repetitivo de bases, quer nos passos de desproteção (piperidina), quer nos passos de acoplamento, limita significativamente a aplicação do ⁱBu como grupo protetor da cadeia lateral de resíduos de sTyr [41].



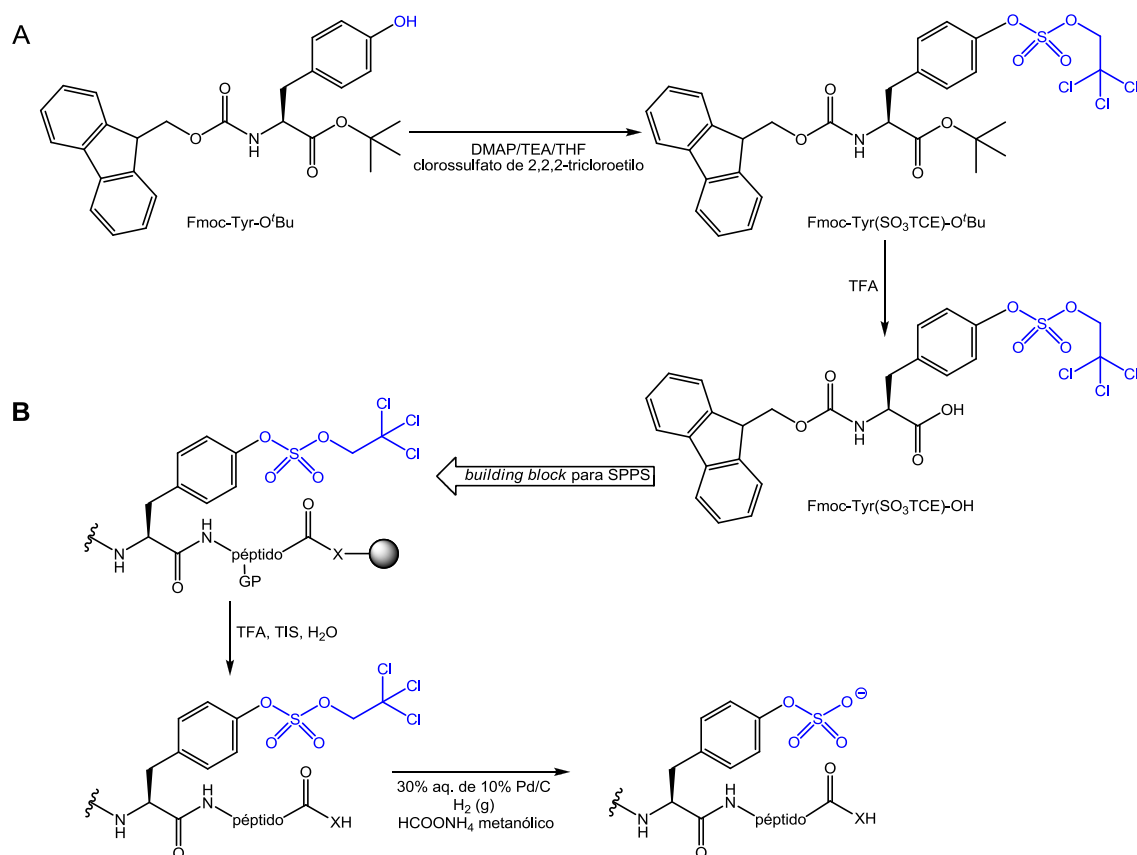
Esquema 10: Esquema de desproteção e clivagem final de um sulfopéptido por incorporação direta de sTyr protegida lateralmente com o grupo nP. A clivagem e desproteção da resina são conseguidas em condições correntes de SPPS via esquema Fmoc/^tBu, na presença de *scavengers* sem enxofre, como o triisopropilsilano (TIS) e água. O grupo nP é removido por tratamento pós-clivagem do péptido com acetato de amónio ou azida sódica. X= -O- ou -NH- para síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido das refs. 42 e 43].

c) Uso do 2,2,2,-triclouroetilo e derivados na proteção lateral de sTyr

O uso do 2,2,2-trifluoroetilo como grupo protetor da cadeia lateral de resíduos de sTyr foi avançado por Proud e colaboradores, mas não se tornou muito popular, uma vez que a sua introdução requer o uso trifluorodiazotano, um reagente instável, perigoso e de difícil preparação [45]. No entanto, o grupo 2,2,2-tricloroetilo (TCE) foi considerado como uma alternativa interessante ao 2,2,2-trifluoroetilo [46-49]. Assim, Taylor *et al.* propuseram o uso do TCE para proteger as cadeias laterais de resíduos de sTyr permitindo, simultaneamente, o uso de resinas Rink-Amida e condições habituais de clivagem em SPPS pela via Fmoc/^tBu, com exceção do uso de 2-metilpiperidina (2-MP) em substituição da piperidina, nas etapas de remoção do grupo Fmoc, uma vez que a piperidina promove a rápida conversão dos sulfo-ésteres de TCE nos correspondentes sulfo-ésteres de diclorovinilo (DCV), por eliminação de HCl [48].

A utilização da 2-MP implica a precipitação do cloreto de 2-metilpiperidínio em cada passo de *N*^α-desproteção, mas este sal é facilmente removido por lavagem com DCM

[48,49]. Nesta abordagem, a clivagem do péptido pode ser efetuada através dos procedimentos habituais usando TFA concentrado (90 a 95%) e *scavengers* sem enxofre, como TIS e água; a remoção do TCE efetua-se após a clivagem, geralmente por hidrogenação catalítica na presença de formato de amónio em metanol durante 1 hora à temperatura ambiente; pode, também, ser realizada por tratamento com Zn, igualmente na presença de formato de amónio em metanol ou em ácido acético [49] (Esquema 11).

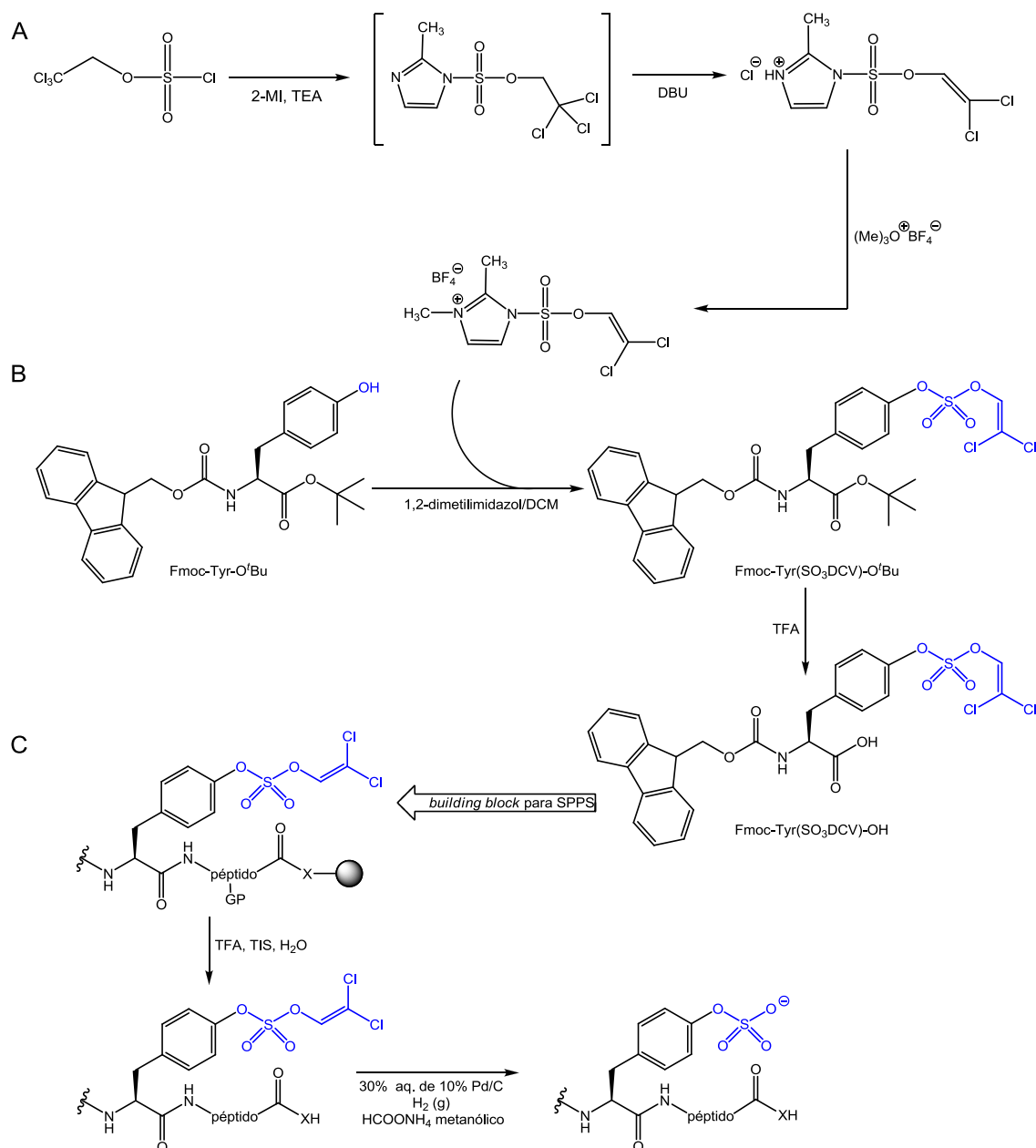


Esquema 11: Esquema de síntese de um sulfopéptido usando sulfotirosinas protegidas lateralmente com o grupo TCE; A) via de síntese para o $\text{Fmoc-Tyr(SO}_3\text{TCE)-OH}$ que vai ser utilizado posteriormente em B) síntese em fase sólida do sulfopéptido pretendido. Os procedimentos correntes em SPPS pela via Fmoc^t/Bu são compatíveis com o uso do grupo TCE, que é removido após a clivagem através de hidrogenação catalítica. X= -O- ou -NH- para síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido da ref. 47].

Uma das desvantagens do uso do grupo TCE como protetor lateral de resíduos de sTyr prende-se com a necessidade de se sintetizar previamente o derivado protegido ($\text{Fmoc-Tyr(SO}_3\text{TCE)-OH}$). O processo de síntese baseia-se na reação do éster *tert*-butilico da tirosina N^F -Fmoc-protégida ($\text{Fmoc-Tyr-O}^t\text{Bu}$) com clorossulfato de 2,2,2-tricloroetilo em tetrahydrofurano (THF), na presença de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) e trietilamina (TEA); a clivagem subsequente do éster *tert*-butilico com TFA

produz Fmoc-Tyr(SO₃TCE)-OH pronto a ser incorporado na cadeia peptídica em crescimento, via Fmoc/^tBu SPPS [47,48] (Esquema 11).

A rápida conversão do TCE em DCV por ação do excesso de bases orgânicas, como a piperidina ou TEA, levou à proposta de utilização do próprio DCV como grupo protetor mais estável da cadeia lateral de resíduos de sTyr. Taylor *et al.* descreveram a síntese de péptidos incorporando resíduos de sTyr lateralmente protegidos com o grupo DCV, como representado no Esquema 12. Tal como ilustrado neste esquema, por reação do clorossulfato de 2,2,2-tricloroetilo com o 2-metilimidazole (2-MI), seguido pela adição de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU), obtém-se um cloreto de imidazólio que se faz reagir com tetrafluoroborato de trimetiloxónio (reagente de Meerwein) para se obter o tetrafluoroborato de *N*-metilimidazólio que é usado para introduzir o DCV na cadeia lateral do éster *tert*-butilico de uma sTyr *N*^ε-Fmoc-protegida, através de uma reação de 3 horas na presença de 1,2-dimetilimidazol, em DCM e à temperatura ambiente. A clivagem do éster *tert*-butilico com TFA produz o Fmoc-Tyr(SO₃DCV)-OH a ser usado na síntese em fase sólida do sulfopéptido. A remoção do DCV após a clivagem pode ser conseguida com bons rendimentos por hidrogenação catalítica [48].

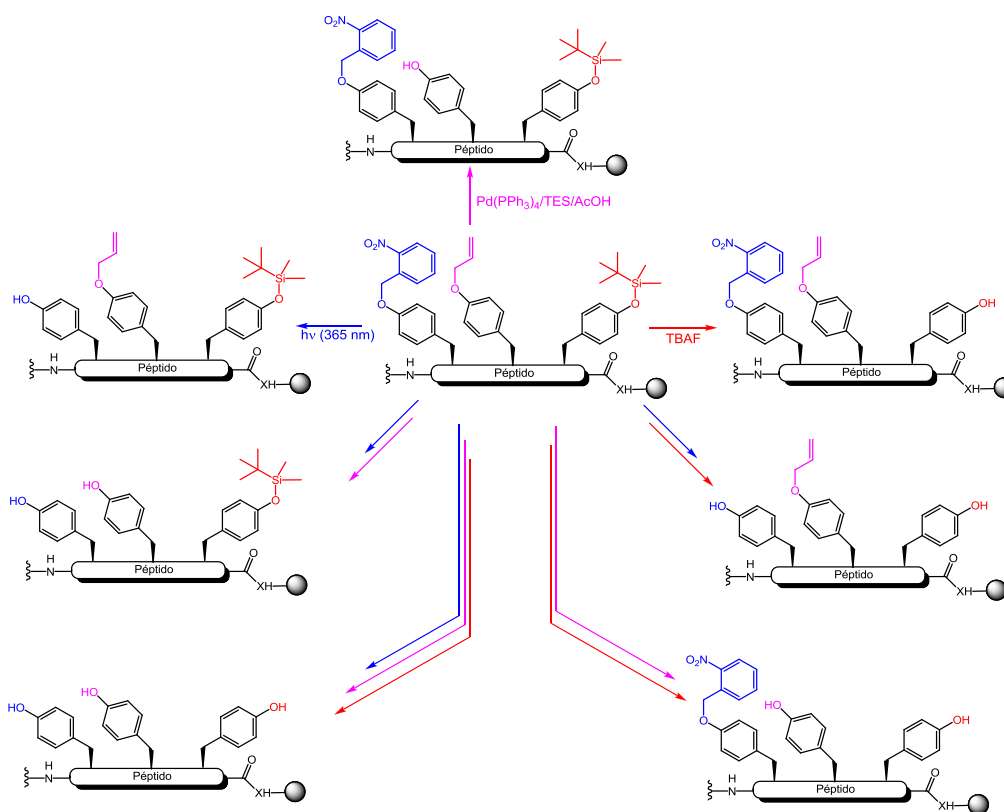


Esquema 12: Síntese de um sulfopéptido usando resíduos de sTyr protegidos lateralmente com o grupo DCV. A) Preparação de um sal de DCV para ser usado em B) Síntese prévia do derivado protegido, Fmoc-Tyr(SO₃DCV)-OH, para ser usado em C) síntese em fase sólida do sulfopéptido pretendido, mediante procedimentos correntes em SPPS pela via Fmoc/^tBu; a remoção do DCV é conseguida através da hidrogenação após a clivagem. X= -O- ou -NH- para a síntese de péptidos carboxilo ou carboxamida, respetivamente, em C-terminal [reproduzido da ref. 38].

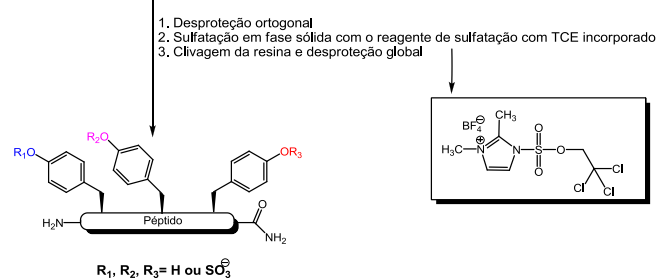
1.2.3 Síntese divergente de péptidos com múltiplas tirosinas sulfatadas

Apesar dos avanços recentes na síntese de sulfopéptidos em fase sólida, não há ainda abordagens sintéticas gerais para a síntese divergente de péptidos multissulfatados. Isto levou Liu *et al.* a explorar a sulfatação “*on resin*” de resíduos de tirosina selecionados, inspirados pelo processo de síntese de Fmoc-Tyr(SO₃TCE)-OH e Fmoc-Tyr(SO₃DCV)-OH (Esquemas 11 e 12). Os autores escolheram incorporar múltiplas tirosinas (não sulfatadas) ortogonalmente protegidas nas cadeias laterais, para permitir a produção de diversos “padrões” de sulfatação a partir de uma única síntese em fase sólida da sequência do péptido não-sulfatado [27, 30]. Assim, Liu *et al.* basearam-se na utilização de três grupos de proteção ortogonal da cadeia lateral da tirosina: *o*-nitrobenzilo (*o*-Nb), alilo (All) e *terc*-butil-dimetilsililo (TBS); após a construção da sequência peptídica, cada um destes grupos pode ser seletiva e diferencialmente removido sem afetar os outros dois, nem os restantes grupos protetores laterais vulgarmente usados em Fmoc/^tBu SPPS (Esquema 13A) [27]. Desta forma, pode-se desproteger seletivamente a(s) tirosina(s) que se deseje sulfatar, sem alterar as restantes: irradiação com luz UV a $\lambda = 365$ nm permite a remoção seletiva do grupo *o*-Nb; o tratamento com Pd(PPh₃)₄, trietilsilano (TES) e ácido acético em DCM remove o grupo All; e por reação com fluoreto de tetrabutylamónio (TBAF) tamponado com ácido acético resulta na remoção seletiva do grupo TBS. A combinação adequada destes passos de desproteção ortogonal leva à exposição do grupo fenol em resíduos de tirosina selecionados para posterior sulfatação “*on resin*”, recorrendo à química de incorporação do grupo TCE na posição desejada; após clivagem nas condições habituais usando TFA/TIS/H₂O, submete-se o péptido a hidrogenação catalítica para remover o grupo TCE, obtendo-se o sulfopéptido (Esquema 13B) [27].

A



B



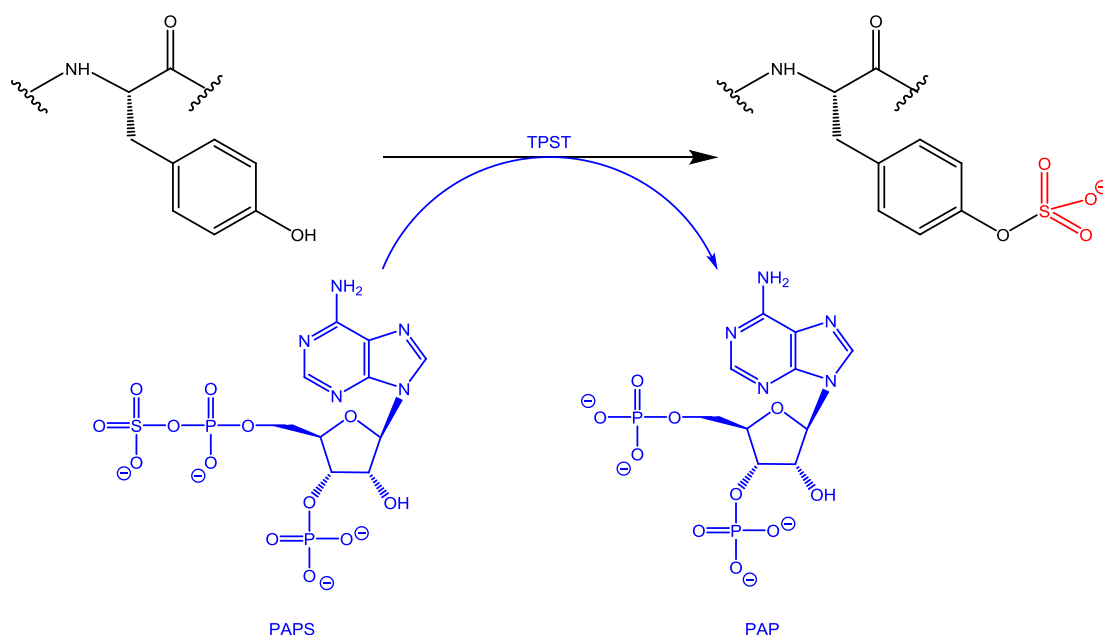
Esquema 13: A) Proteção ortogonal das cadeias laterais de três resíduos de tirosina da mesma sequência peptídica de partida, permitindo a síntese divergente de sete péptidos com diferentes padrões de sulfatação. B) Sulfatação “on resin” de resíduo (s) de tirosina (s) desprotegido (s) [reproduzido da ref. 27].

1.3 Importância Biológica da Tirosina Sulfatada

A O-sulfatação dos resíduos de tirosina foi descoberta por Bettelheim, há mais de quatro décadas, num péptido derivado do fibrinogénio de bovino [50]. Até agora, a tirosina sulfatada tem sido encontrada exclusivamente em proteínas segregadas e, consequentemente, tem sido proposta como assumindo um papel relevante na secreção de proteínas. Estudos sugerem que até 1% do total de resíduos de tirosina do proteoma de um organismo podem existir na, ou adquirir a, forma O-sulfatada [51]. Assim, a sulfatação é a PTM mais comum em resíduos de tirosina [52], que é, aparentemente, o único aminoácido passível de sofrer este tipo de modificação [53].

Em meados dos anos 80, Huttner *et al.* observaram a presença de tirosinas sulfatadas em diversas proteínas de diferentes linhas celulares e tecidos, reforçando a ideia que a sulfatação da tirosina é uma PTM relativamente comum [54]. Desde então, resíduos de sTyr têm sido identificados em várias proteínas de diferentes animais, incluindo mosca da fruta [51], rato [55,56], vaca [56,57] e humanos [58] e, também, em diferentes plantas, desde algas verdes do género *Volvox* a plantas superiores, como o arroz [53]. Na verdade, alguns estudos apontam que a sulfatação da tirosina em proteínas (PTS, do inglês *protein tyrosine sulfation*) tem grande importância no crescimento das plantas [59]. Enquanto ocorre ao longo da evolução dos metazoários, a PTS está ausente em procariontes e eucariontes unicelulares, o que parece associar a PTS a algum aspeto de multicelularidade [53]. Na PTS, um grupo sulfato é transferido do 5'-fosfossulfato de 3'-fosfoadenosina (PAPS, do inglês *3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate*) para o grupo hidroxilo de um resíduo de tirosina, formando o correspondente O-sulfo-éster (Esquema 14) [60]. Este processo ocorre na face *trans* do complexo de Golgi e é catalisado por duas enzimas transmembranares do tipo II, as tirosilproteína sulfotransferases 1 e 2 (TPST 1 & 2) [61]. Além de sobre-expressas no fígado, as TPST estão uniformemente distribuídas pela maior parte dos tecidos [62].

Muitas proteínas sulfatadas estão reconhecidamente envolvidas em interações proteína-proteína, que parecem ser conduzidas, pelo menos em parte, pelo reconhecimento do próprio grupo sulfato [63]. Foi observado que os resíduos de sTyr são muitas vezes agrupados de forma bem definida, frequentemente na proximidade de regiões de carga negativa, ou seja, na proximidade de resíduos de aminoácidos ácidos. Na verdade, tem sido relatado que um dos fatores determinantes em PTS é a proximidade de aminoácidos ácidos na vizinhança de resíduos de sTyr, em conjugação com elementos de estrutura secundária e terciária que favoreçam a exposição para a ocorrência da sulfatação mediada pelas TPST [64,65].



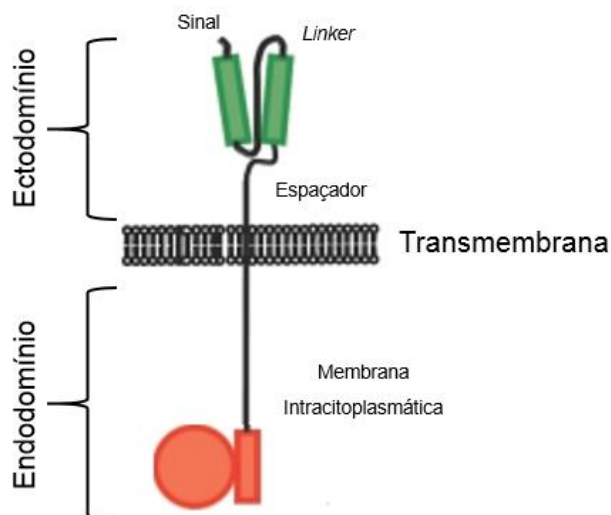
Esquema 14: PTS de um péptido através da sulfatação da tirosina. As tirosilproteína sulfotransferases (TPST) catalisam a transferência de um grupo sulfato da 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS, do inglês *3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate*) para o substrato do péptido, com libertação concomitante de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP, do inglês *3'-phosphoadenosine-5'-phosphate*) [52].

Na maioria das proteínas sulfatadas conhecidas, não é ainda bem compreendida a tarefa específica da sTyr, mas tem-lhe sido atribuído um papel crucial em interações proteína-proteína. As proteínas sulfatadas e as TPST têm sido reconhecidas como detendo papéis-chave em muitos processos biológicos, incluindo homeostasia, deslocamento de leucócitos sob células endoteliais, processamento proteolítico ótimo (por exemplo, processamento da gastrina), funções visuais, ativação proteolítica de proteínas extracelulares (como por exemplo, ativação do factor V e VIII), entrada de vírus nas células (entrada de HIV-1) e reconhecimento ligando-recetor [62,66]. Ainda que, como atrás referido, a importância funcional da PTS se tenha atribuído à secreção de proteínas [67], a(s) função(ões) exata(s) da sulfatação permanece(m) desconhecida(s), identificando-se apenas os seus efeitos biológicos [68]. Alguns exemplos de proteínas sulfatadas identificadas em mamíferos incluem a proteína complementar C4 [69]; proteínas de coagulação do sangue, tais como o fator V [70] e o fator VIII [71], moléculas de adesão à superfície celular (CAM, do inglês *cell-surface adhesion molecules*) [72] e o ligante da glicoproteína P-selectina 1 [66,73].

No início do século XXI, renasceu o interesse da comunidade científica no estudo da importância da PTS, despoletado pela descoberta de um recetor de quimiocinas com tirosinas sulfatadas [74]. As quimiocinas são pequenas proteínas

segregadas pelos organismos e que estão envolvidas em transporte de leucócitos, angiogénese, angiectasia e resposta imune do hospedeiro, tanto em infeções como em neoplasias. Estas proteínas exercem os seus efeitos através de recetores acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G-protein-coupled receptors*) das células-alvo [63,74], via interações essenciais para recrutamento de leucócitos em respostas inflamatórias, ou retorno de linfócitos (do inglês, *lymphocyte homing*). Um conhecimento detalhado das funções biológicas da PTS reveste-se da maior importância, quer em infeção, quer em cancro. No caso de neoplasias, as células tumorais que expressam recetores de quimiocina tendem a migrar para os tecidos que expressam ligandos de quimiocina, promovendo assim a metástase. Por outro lado, os recetores de quimiocinas são também usados por agentes patogénicos como o vírus HIV-1/SIDA ou o parasita protozoário *Plasmodium vivax*, para facilitar a infeção em leucócitos ou reticulócitos, respetivamente [60]. Tem sido relatado que vários recetores de quimiocinas (CCR5, CXCR4, CCR2B, CX3CR1 e CXCR3) sofrem PTS em resíduos de tirosina agrupados na região *N*-terminal, e que tal modificação parece desempenhar um papel crucial para o reconhecimento e ativação dos seus ligandos cognatos [75]. Por exemplo, a entrada do HIV-1 numa célula-alvo requer a expressão tanto do recetor CD4 como de um co-recetor de quimiocinas, normalmente CCR5, cujos resíduos de sTyr da região *N*-terminal são necessários para o ótimo funcionamento do recetor e co-recetor [76,77].

Os resíduos de sTyr desempenham também papéis reguladores importantes em vários outros GPCR, bem como em alguns recetores não acoplados à proteína G. A característica comum a todos estes recetores é a presença de um grande ectodomínio (por exemplo, a CD4 reconhece o ectodomínio das células infetadas com HIV), geralmente localizado na extremidade *N*-terminal a montante da primeira hélice transmembranar (Esquema 15). Por outro lado, estudos de mutagénese direcionada (SDM, do inglês *site-directed mutagenesis*) para posições de “tirosinas sulfatáveis” demonstraram que a substituição destas por outros aminoácidos conduz a uma diminuição da afinidade do agonista para com o seu recetor cognato, reforçando que a presença de resíduos de sTyr em GPCR é crucial para a sinalização apropriada [73].



Esquema 15: Representação esquemática do recetor transmembranar, com as suas regiões extracelular (ectodomínio) e intracelular (endodomínio). Os ectodomínios estão geralmente envolvidos no contacto com outras superfícies, desencadeando-se processos de sinalização celular [adaptado da ref.78]

A PTS tem sido igualmente associada à resposta inflamatória, onde estão envolvidas várias proteínas. Por exemplo, proteínas que atuam como CAM desempenham um papel no recrutamento de leucócitos inflamatórios e a sua função parece ser influenciada pela sulfatação da tirosina; assim, as CAM foram identificadas como sendo potenciais alvos terapêuticos para fármacos anti-inflamatórios que atuam como inibidores da PTS [72]. Um exemplo onde a sulfatação parece ter influência na eficiência da interação entre uma CAM e o seu ligando cognato é o da interação entre a P-selectina e o ligante da glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1). A PSGL-1 é uma glicoproteína encontrada em leucócitos e células endoteliais, que possui alta afinidade com a P-selectina, uma proteína encontrada na superfície das células endoteliais ativadas, onde funciona como uma CAM [63]. A região *N*-terminal da PSGL-1 tem três potenciais locais de sulfatação, a qual foi identificada, juntamente com glicanos específicos na PSGL-1, como um fator determinante para a ligação à P-selectina. Esta ligação é essencial para a adesão de leucócitos em respostas inflamatórias, bem como no contexto de algumas doenças, como a aterosclerose ou a infeção pelo enterovírus EV71 [66].

Vários estudos sugerem que a PTS é igualmente importante na homeostasia. Foi demonstrado que a sulfatação afeta o processamento intracelular da progastrina, a proteína precursora das gastrinas. Estas são proteínas reguladoras importantes na secreção de suco gástrico e crescimento da mucosa gastrointestinal, sendo sintetizadas principalmente nas células G da mucosa antral. O processamento da

progastrina produz gastrina-17 e gastrina-34, as formas bioativas predominantes, que se apresentam na forma carboxamida em C-terminal, bem como parcialmente sulfatadas [72].

A PTS parece também desempenhar um papel relevante na anti-coagulação. Por exemplo, a sulfatação da tirosina existente na posição 63 da sequência da hirudina, um potente anticoagulante segregado pela glândula salivar da sanguessuga, resulta numa afinidade dez vezes superior para a trombina do que a da sua forma não sulfatada [66,80]. A hirudina liga-se irreversivelmente à trombina através de um complexo não covalente, inibindo a coagulação do sangue via conversão de fibrinogénio em fibrina mediada pela trombina [71]. Atendendo a que os inibidores da trombina são considerados excelentes candidatos para várias aplicações terapêuticas, um entendimento abrangente de como a PTS influencia a inibição de trombina será importante na abordagem a patologias onde a regulação da coagulação sanguínea seja relevante, desde doenças do foro vascular, até infeções mediadas por vetores que utilizam estratégias de anti-coagulação para poderem injetar formas infecciosas do agente patogénico na circulação sanguínea do hospedeiro (ver 1.4).

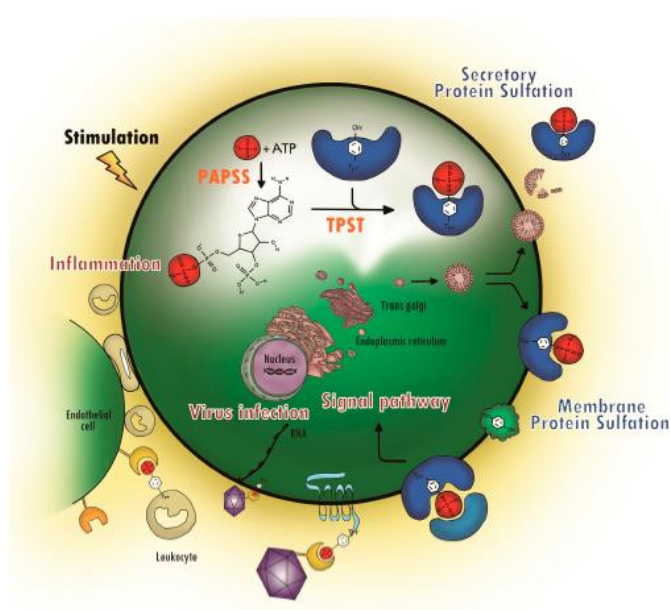


Figura 4: Representação esquemática das vias biológicas da sulfatação de tirosinas numa proteína (PTS). A integração do grupo sulfato em tirosinas em proteínas e os seus efeitos sobre interações proteína-proteína induzem diversas respostas fisiológicas e têm sido associados a diferentes patologias [Adaptado da ref. 66].

Em suma, a PTS influencia muitos processos fisiológicos (Figura 4), mas quer a sua função exata, quer a razão porque está ausente em procariotas e eucariotas unicelulares, permanecem um enigma [30]. Portanto, todos os estudos químicos, bioquímicos ou biológicos que contribuam, de alguma forma, para um conhecimento mais amplo e mais profundo da PTS, revestem-se da maior importância e atualidade.

1.4 Péptido TTI

Tal como referido na secção anterior, a PTS parece ter um papel relevante em mecanismos de coagulação mediados por trombina, o que pode ser explorado com vista a diferentes aplicações terapêuticas [81]. A trombina é uma protease serina multifuncional, que quebra ligações peptídicas após resíduos de arginina ou de lisina, tendo um papel importante em diferentes fenómenos biológicos como hemostasia, trombose, inflamação e resposta proliferativa [81,82].

A inibição de trombina é, também, um processo relevante para a alimentação de seres hematófagos. A saliva dos invertebrados hematófagos contém um conjunto diversificado de moléculas anti-coagulantes, incluindo inibidores de trombina, vasodilatadores e inibidores das funções das plaquetas. Estes agentes anti-hemostáticos facilitam a rápida formação de um hematoma subcutâneo a partir do qual o inseto pode sugar o sangue de forma eficiente [83]. Um desses agentes é o péptido TTI (do inglês, *tsetse thrombin inhibitor*), um potente inibidor específico da trombina humana, isolado de extratos da glândula salivar da mosca tsé-tsé, *Glossina morsitans morsitans*, responsável pela transmissão da tripanossomíase africana (ou doença do sono) [81-85]. Este péptido é estável ao calor e foi comprovado que inibe as atividades amidolíticas e esterolíticas da trombina, bem como a agregação das plaquetas induzida pela própria trombina [85,86].

Os primeiros 20 aminoácidos do TTI (Figura 5) não revelam homologia significativa com quaisquer inibidores da protease serina previamente identificados ou de reconhecidas propriedades anti-coagulantes, o que sugere que o TTI pode representar uma classe nova e única de inibidores daquelas proteases. O gene que codifica este péptido anti-coagulante foi o primeiro a ser clonado, sabendo-se que é expresso no intestino da mosca tsé-tsé no decurso da sua refeição sanguínea, o que sugere que o TTI tem um papel biológico tanto na alimentação como digestão. Como tal, pode representar um alvo único para futuras estratégias de combate à tripanossomíase africana humana (HAT, do inglês *human african trypanosomiasis*) que

visem limitar a sobrevivência da mosca tsé-tsé, reduzindo a transmissão de HAT [83]. Tal reveste-se da maior importância, pois, atualmente, não há vacinas eficazes para prevenir a HAT. Por outro lado, o uso generalizado de fármacos “anti-tripanosossomiais” tem sido associado ao desenvolvimento de resistência parasítica. Portanto, a redução da população da mosca tsé-tsé, em áreas agrícolas e residenciais, torna-se uma importante estratégia de controlo da doença. Assim, será crucial conseguir uma completa caracterização do proteoma da mosca tsé-tsé, onde se inclui o TTI, o que permitirá saber como este e outros péptidos/proteínas se relacionam com a sobrevivência daquele vetor e a aquisição de HAT, com vista ao desenvolvimento de novas estratégias anti-tripanosossomíase. Por exemplo, será importante determinar se a inibição *in vivo* da formação/ação biológica do TTI prejudica a capacidade da mosca tsé-tsé se alimentar do sangue dos seus hospedeiros vertebrados, e de que forma a eventual ocorrência de sulfatação pós-tradução do TTI poderá influenciar a sua capacidade anti-trombótica [86].

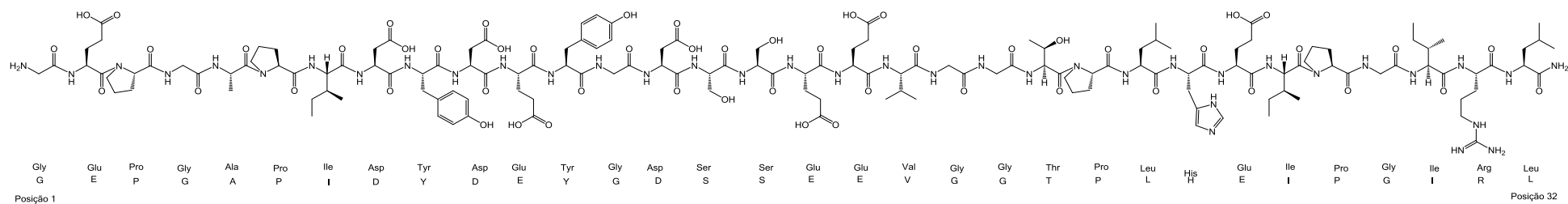


Figura 5: Estrutura molecular do péptido TTI e respetiva identificação dos aminoácidos que o constituem.

2. Objetivo

O objetivo da presente dissertação foi a síntese, em fase sólida, do péptido TTI e de três dos seus derivados sulfatados, obtidos por substituição de cada um ou de ambos os seus resíduos de Tyr por resíduos de sTyr. Ou seja, os quatro péptidos-alvo do presente trabalho foram os seguintes:

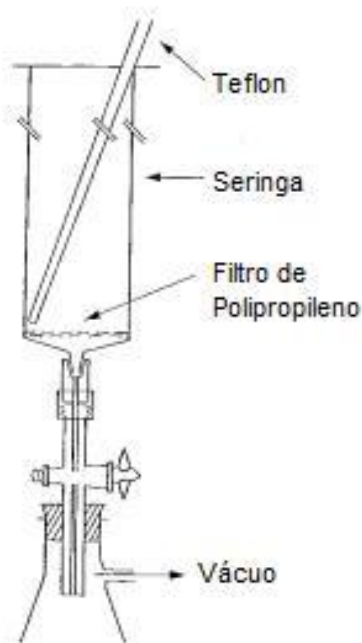
Péptido TTI:	GEPGAPIDYDEYGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL
Péptido ¹²sTyr-TTI:	GEPGAPIDYDEsYGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL
Péptido ⁹sTyr-TTI:	GEPGAPIDsYDEYGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL
Péptido ^{9,12}sTyr-TTI:	GEPGAPIDsYDEsYGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL

Os péptidos sintetizados foram estudados no grupo de Estrutura de Biomoléculas do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto, através de ensaios bioquímicos *in vitro* e de análises estruturais por cristalografia de difração de raios X, para determinar a sua afinidade para com a trombina humana e estabelecer (a) a influência do grau de sulfatação na afinidade dos péptidos para com a trombina, e (b) quais os resíduos de aminoácidos mais relevantes para uma interação péptido-trombina eficaz.

3. Procedimento Experimental

A montagem do sistema manual para SPPS está ilustrada no Esquema 16; como se pode aí observar, é utilizada uma seringa, dotada de um filtro poroso, como vaso reacional; a seringa está adaptada a um sistema de vácuo para eliminação de resíduos após cada ciclo reacional e lavagens da resina com DCM e DMF, usando-se uma vareta de teflon para agitação ocasional da mistura reacional.

3.1 Esquema de montagem



Esquema 16: Esquema da montagem experimental para SPPS manual

Todas as sínteses foram efetuadas por via manual, com exceção de uma, em que se recorreu à SPPS assistida por micro-ondas, usando-se um instrumento Liberty1 da CEM (Figura 3, secção 1.1.5).

3.2 Reagentes e equipamentos utilizados

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram das marcas Novabiochem (resina Fmoc-Rink Amida MBHA 0,38 mmol/g, aminoácidos protegidos), Merck (TFA, solventes) e Sigma-Aldrich (todos os restantes).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência hifenada com espectrometria de massa (LC/MS) foram realizadas quer no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (DQB-FCUP), usando um instrumento Finnigan Surveyor LCQ DECA XP MAX, equipado com espectrómetro de massa com ionização por eletro-nebulização e detecção por armadilha de iões (ESI-IT MS), ou no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), usando um instrumento Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL, também de ESI-IT MS, com detetor do tipo Orbitrap.

Os péptidos foram purificados por cromatografia líquida de fase reversa a média pressão (RP-MPLC) usando uma fase estacionária C₁₈ Vydac® 218TP, da Grace Vydac.

Para se avaliar o grau de pureza dos péptidos, recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando-se um equipamento LaChrom Elite da Merck-Hitachi, dotado de bomba quaternária, injetor automático termostaticado por efeito Peltier e detetor de díodos. Usou-se uma coluna (125 x 4,0 mm) de fase reversa Purospher star RP C-18 (5 µm de diâmetro de partícula). A eluição foi realizada em modo gradiente variável 0-100%, 5-50%, 15-45% e 20-50%, em ACN, usando este solvente orgânico em água (contendo 0,05% de TFA) como fase móvel, um fluxo de 1 mL/min e detecção ao comprimento de onda de 220 nm. Após purificação e caracterização, os péptidos finais foram liofilizados num equipamento BenchTop Pro 9L da Virtis do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (DQB-FCUP).

3.3 Preparação do teste de Kaiser (teste da ninidrina)

O teste da ninidrina (secção 1.4) permitiu detetar a presença de grupos amino primários na peptidil-resina, constituindo um meio de avaliação qualitativa do sucesso, quer da incorporação dos aminoácidos durante os passos de acoplamento, quer da remoção do grupo Fmoc durante os passos de desproteção. O teste realiza-se misturando a peptidil-resina com algumas gotas de dois reagentes, A e B, cuja preparação prévia se descreve em seguida.

Reagente A: preparou-se uma solução de fenol (40 g) em etanol (10 mL). Posteriormente, preparou-se uma solução de 6,5 mg de KCN em 10 mL de H₂O, retirando-se 2 mL desta solução para se adicionar a 100 mL de piridina destilada. Normalmente, é aconselhada a execução de um passo adicional antes da mistura destas duas soluções, as quais se devem previamente incubar com resina Amberlite MB-3 durante 45 minutos, seguindo-se filtração e mistura das soluções filtradas. No entanto, este último passo não foi realizado, pois o nosso grupo havia anteriormente constatado ser desnecessário.

Reagente B: Dissolveu-se 2,5 g de ninidrina em 50 mL de etanol absoluto. Esta solução foi protegida da luz.

Para realizar o teste na peptidil-resina, alguns grãos desta foram recolhidos para um tubo de ustulação, no final de cada ciclo de acoplamento ou desproteção. Depois, foram adicionadas 3 gotas de reagente A e 1 gota de reagente B, colocando-se o tubo a 100 °C durante 3 minutos. Após arrefecimento do tubo de ustulação, observou-se a coloração obtida. Quando a coloração dos grãos foi a esperada (coloração amarela após o acoplamento do aminoácido ou coloração azul escura após a desproteção do grupo amino, Figura 6), continuou-se com a síntese peptídica. Caso contrário, quando o resultado não foi o pretendido (acoplamento ou desproteção podem ter sido incompletos), foi novamente repetido o passo em questão, até se obter o resultado desejado.



Figura 6: Resultado positivo (azul escuro, grupos amino livres, ou seja, resultado esperado após uma desproteção) e negativo (amarelo pálido, grupos amino protegidos, ou seja, resultado esperado após um acoplamento) do teste da ninidrina.

3.4 Preparação da resina

Realizou-se a montagem experimental do Esquema 16 e, posteriormente, colocou-se a resina seca (0,169 g) na seringa, adicionando-se DMF e agitando-se durante 15 minutos (“solvatação” da resina). Filtrou-se a resina e adicionou-se DCM, agitando-se também durante 15 minutos (“inchamento” da resina). Após filtração, passou-se à remoção do grupo Fmoc, por tratamento da resina com uma solução de piperidina a 20% em DMF (2 mL, 1×1 min + 1×20 min) durante 20 minutos, agitando-se ocasionalmente. Após a desproteção, lavou-se a resina com DMF (2 mL, 3×1 min) e DCM (3×1 min) e retirou-se alguns grãos para efetuar o teste da ninidrina. Quando se observou uma coloração azul escura (resultado positivo), avançou-se com a construção do péptido. Caso contrário (resultado negativo), repetiu-se o tratamento com piperidina até obtenção do resultado desejado.

3.5 Acoplamento dos aminoácidos

Preparou-se uma solução de Fmoc-AA-OH (5 eq), HBTU (5 eq) e DIEA (10 eq) em DMF (2 mL), deixando-se a reagir durante 5 minutos para fazer a pré-ativação do aminoácido. Posteriormente, adicionou-se a solução à resina já desprotegida, deixando-se a reagir sob agitação durante 1 hora. Findo o período de reação, fez-se a filtração da resina e lavou-se com DMF (2 mL, 3×1 min) e DCM (3 mL×1 min). Retirou-se alguns grãos da peptidil-resina para efetuar o teste da ninidrina e, quando o resultado foi o esperado (negativo), avançou-se para a remoção do grupo Fmoc, seguindo o procedimento já descrito na secção anterior. Havendo indícios de acoplamento incompleto (teste de ninidrina positivo), repetiu-se o passo de acoplamento até obtenção do resultado pretendido.

3.6 Clivagem do péptido e desproteção das cadeias laterais

Preparou-se um cocktail de clivagem com TFA (95%), TIS (2,5%) e H₂O (2,5%), na *hotte*. Dividiu-se a peptidil-resina seca em porções de 100 mg, que se colocaram em tubos *Falcon* de 15 mL, adicionando-se a cada tubo 1 mL de cocktail de clivagem. Deixou-se a reagir à temperatura ambiente, sob agitação contínua, durante 1,5 h. Finda a reação de clivagem/desproteção lateral, foram testados dois modos distintos de proceder à separação e eliminação da resina, como a seguir se descreve.

3.6.1 Clivagem com filtração da resina na solução de TFA

Montou-se, na *hotte*, um sistema de filtração sob vácuo usando um funil de placa porosa com porosidade D4. Verteu-se a mistura contida nos tubos de *Falcon* para o funil, que reteve a resina, estando o péptido solubilizado no filtrado. Este foi dividido em frações de 1,5 mL, que se transferiram para tubos de *falcon* de 15 mL, perfazendo-se o restante volume com éter dietílico seco ou éter terc-butilmetílico (MTBE) seco, para precipitação do péptido. Colocaram-se os tubos a -24 °C (congelador) durante 15 minutos, após o que se centrifugou a -5°C e 3330 rotações por minuto (rpm), decantando-se o sobrenadante para um matrás com rolha. Ressuspendeu-se o resíduo sólido em nova porção de éter dietílico seco ou MTBE seco, repetindo-se a centrifugação e a decantação. Este procedimento foi repetido por mais três vezes, colocando-se o resíduo sólido final (péptido bruto) a secar em exsiccador de vácuo. Retirou-se uma fração do filtrado para se analisar por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), armazenando-se as restantes frações no congelador até eventual purificação posterior.

3.6.2 Clivagem com filtração da resina na solução de ácido acético

Adicionou-se éter dietílico seco ou MTBE seco diretamente aos tubos contendo a mistura de clivagem, para precipitação do péptido. Colocaram-se os tubos a -24 °C (congelador) durante 15 minutos, após o que se centrifugou a -5 °C e 3330 rotações por minuto (rpm), decantando-se o sobrenadante para um matrás com rolha. Ressuspendeu-se o resíduo sólido em nova porção de éter dietílico seco ou MTBE seco, repetindo-se a centrifugação e a decantação. Este procedimento foi repetido por mais três vezes, colocando-se o resíduo sólido final (mistura de péptido bruto e resina) a secar em exsiccador de vácuo, durante uma noite.

Adicionou-se, à mistura sólida contida nos tubos, o volume mínimo de solução aquosa de CH₃COOH a 10% necessário para solubilizar totalmente o péptido, deixando-se sob agitação contínua durante 20 minutos. Montou-se, na *hotte*, um sistema de filtração sob vácuo usando um funil de placa porosa com porosidade D4. Verteu-se a mistura contida nos tubos de *Falcon* para o funil, que reteve a resina, estando o péptido solubilizado no filtrado. Retirou-se uma fração do filtrado para se analisar por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), armazenando-se as restantes frações no congelador, para posterior liofilização.

3.7 Remoção do grupo neopentilo

Na síntese dos péptidos sulfatados, as cadeias laterais dos resíduos de sTyr encontravam-se protegidas com o grupo neopentilo (nP), que não é removido na etapa de clivagem com TFA concentrado (secção 3.6). Assim, foram testados diferentes métodos de remoção do nP, com base em dados da literatura, conforme a seguir se descreve. De notar que se descrevem apenas as condições estabelecidas após otimização experimental de cada método testado.

3.7.1 Método do acetato de amónio [42]

Solubilizou-se o péptido seco em água desionizada (cerca de 1 mL/mg) e adicionou-se acetato de amónio de modo a obter-se uma concentração final de 1,5 M. Aqueceu-se a mistura a 37 °C e deixou-se sob agitação magnética por um período que dependeu da quantidade de péptido a desproteger. A evolução da reação foi monitorizada por HPLC.

3.7.2 Método da azida de sódio com DMSO [42]

Dissolveu-se o péptido seco num volume mínimo de DMSO e adicionou-se azida de sódio (10 eq), deixando-se depois a reagir a 50 °C, sob agitação magnética, durante um período de tempo dependente da quantidade de amostra. A evolução da reação foi monitorizada por HPLC.

3.7.3 Método da azida de sódio com H₂O ultrapura [43]

Suspendeu-se o péptido seco em água ultrapura (1 mL/mg) e adicionou-se azida de sódio (50 eq), colocando-se a reagir a 70 °C, sob agitação magnética durante um período de tempo dependente da quantidade de amostra. A evolução da reação foi monitorizada por HPLC.

3.8 Purificação dos Péptidos

Após a obtenção dos péptidos-alvo, estes foram purificados por cromatografia líquida preparativa de fase reversa de média pressão (MPLC), usando octadecilsilano como fase estacionária. Em condições gerais, na purificação de péptidos é usada uma eluição em modo gradiente de misturas de acetonitrilo e água com 0,05% de TFA. No entanto, visto que os resíduos de tirosina sulfatada não são estáveis em condições acídicas, os derivados sulfatados do TTI foram purificados em condições ligeiramente diferentes.

3.8.1 Purificação do Péptido TTI

O péptido TTI impuro foi solubilizado no mínimo volume de solução aquosa de AcOH a 10%, sendo seguidamente purificado por MPLC, através de um gradiente de eluição de 15 a 45% de ACN em água, acidulada com 0,05% de TFA. As frações recolhidas foram analisadas por HPLC para determinar quais continham o péptido com um grau de pureza superior a 92%, sendo essas combinadas para posterior liofilização.

3.8.2 Purificação das variantes sulfatadas do Péptido TTI

Os derivados sulfatados do TTI foram solubilizados no mínimo volume de solução aquosa de acetato de amónio a 0,1 M, sendo seguidamente purificados por MPLC, através de um gradiente de eluição de 5 a 50% de ACN em solução aquosa de acetato de amónio a 0,1 M. As frações recolhidas foram analisadas por HPLC para determinar quais continham o péptido com um grau de pureza superior a 92%, sendo essas combinadas para posterior liofilização.

4. Resultados Obtidos e Discussão

4.1 Síntese do segmento C-terminal de 20 aminoácidos

Atendendo a que o segmento de 20 aminoácidos C-terminal do TTI (péptido 20AA, Tabela 2) é comum aos quatro péptidos-alvo, decidiu-se sintetizar esta sequência à escala de 0,2 mmol sobre uma resina do tipo Fmoc-Rink com um grau de funcionalização de 0,38 mmol/g. Para tal, recorreu-se a síntese automatizada assistida por micro-ondas, utilizando o equipamento Liberty1 da CEM disponível no laboratório. Este equipamento permite escolher se é ou não pretendida a desproteção final (remoção do grupo Fmoc) do grupo α -amino do aminoácido N-terminal, sendo frequente optar-se por manter o grupo α -amino terminal protegido em segmentos peptídicos precursores dos péptidos-alvo e cuja utilização imediata não esteja prevista. Optou-se por abordar a síntese das duas formas possíveis, para comparação, ou seja, visando-se a obtenção das sequências N^α-desprotegida (20AA) e N^α-Fmoc-protegida (Fmoc-20AA), apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Massa molar do segmento de 20 aminoácidos C-terminal do TTI, nas formas protegida e desprotegida.

Péptido	Sequência	Massa Molar/g.mol ⁻¹
Fmoc-20AA	Fmoc-GDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	2285
20AA	GDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	2062

Uma vez concluída a síntese do péptido 20AA, clivou-se uma alíquota da peptidil-resina obtida, para averiguar se a sequência de 20 aminoácidos tinha sido sintetizada corretamente. A clivagem foi realizada conforme descrito na secção 3.6.1., e o produto bruto, após secagem em exsiccador, foi analisado por HPLC (Figura 7) e LC/ESI-Orbitrap MS (Figura 8).

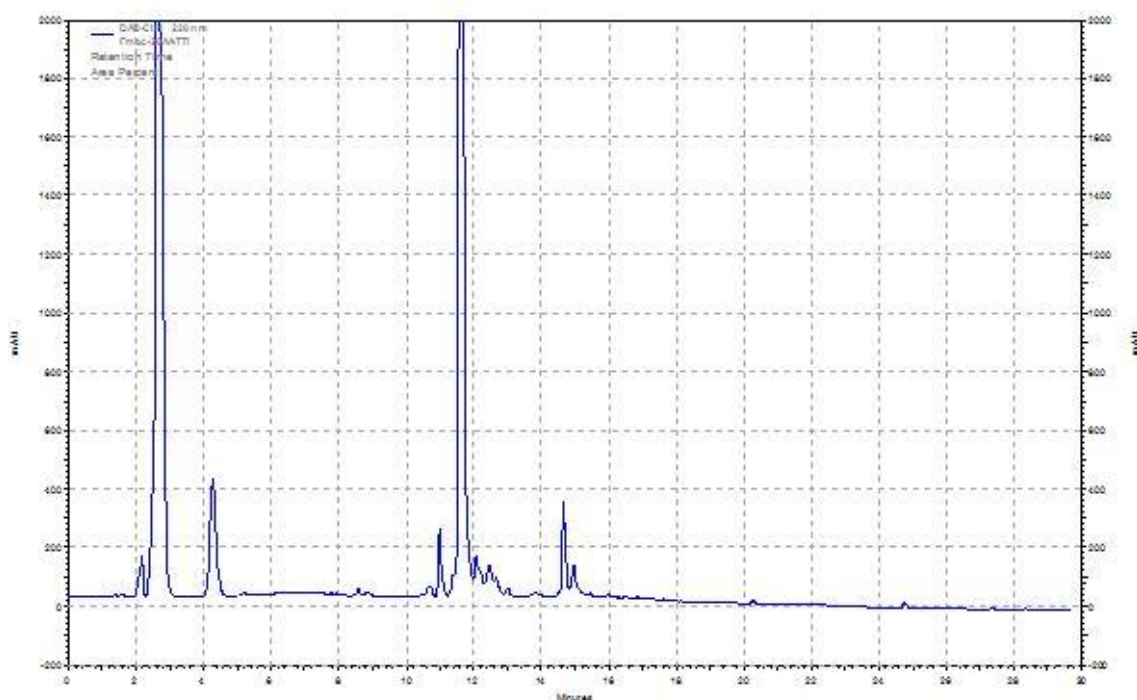


Figura 7. Cromatograma do péptido 20AA, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

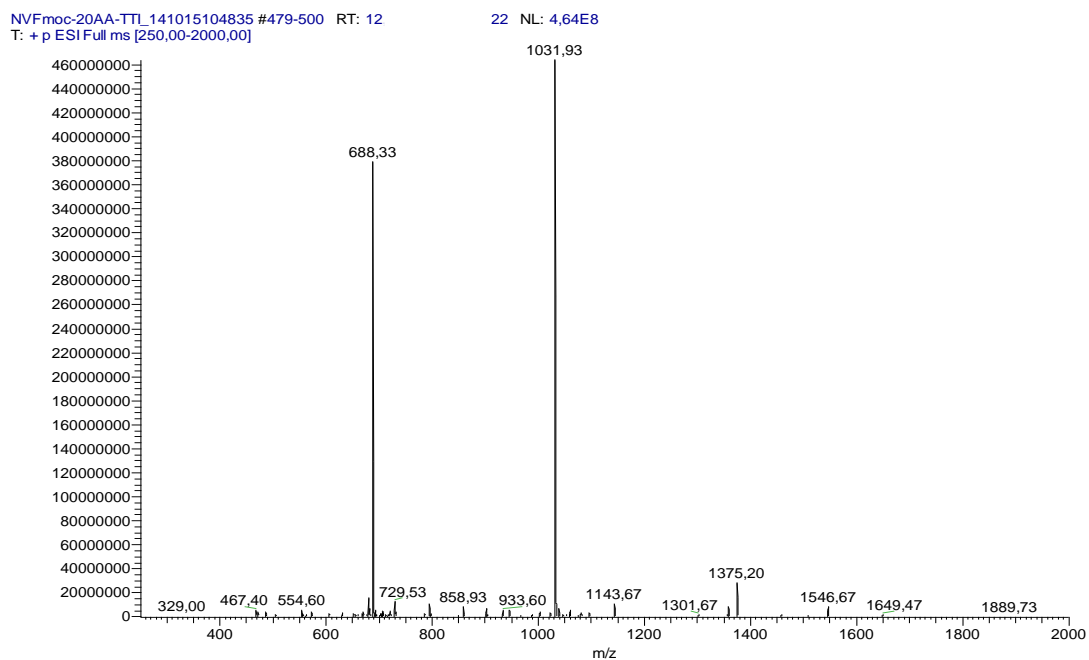


Figura 8. Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do péptido 20AA.

No cromatograma reproduzido na Figura 7, podemos observar a existência de um pico principal com tempo de retenção (t_r) de 11,9 minutos, que se verificou corresponder ao péptido 20AA, ou seja, à sequência-alvo desprovida do grupo Fmoc (MM=2062 g/mol), de acordo com análise realizada por espetrometria de massa. O espetro de massa obtido reproduz-se na Figura 8, onde o pico-base e o segundo pico mais intenso surgem, respetivamente, aos valores de m/z de 1031.93 e de 688.33 unidades de massa atómica (u.m.a.). Estes valores são compatíveis com as formas diprotonada $[P+2H]^{2+}$ e triprotonada $[P+3H]^{3+}$ (Tabela 3) do péptido 20AA.

Tabela 3. Adutos protonados do péptido 20AA, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap)

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[P + 2H]^{2+}$	1031,02	1031,93
$[P + 3H]^{3+}$	688,02	688,33

Após a confirmação do sucesso da síntese do péptido 20AA que, como atrás referido, foi realizada por clivagem e análise de uma alíquota da correspondente peptidil-resina, esta foi dividida em quatro porções idênticas, sendo cada uma posteriormente utilizada para prosseguir com a síntese manual dos quatro péptidos-alvo, TTI, ⁹sTyr-TTI, ¹²sTyr-TTI e ^{9,12}sTyr-TTI, conforme descrito na secção 4.2.

Relativamente à síntese do péptido N^{α} -protegido, Fmoc-20AA, verificou-se (HPLC e ESI-IT MS/Orbitrap, dados não apresentados) que a mesma não foi eficaz, no sentido em que uma fração significativa do péptido foi obtida na forma desprotegida, ou seja, como sequência 20AA. Este problema foi igualmente observado nas sínteses de outros péptidos Fmoc-protegidos realizadas por outros investigadores do grupo, o que sugere a existência de algum tipo de falha no sistema microfluídico do equipamento usado, eventualmente contribuindo para “carry-over” de piperidina nas linhas de solvente, com conseqüente desproteção parcial da peptidil-resina contida no reator. Assim, a opção de síntese automática de péptidos N^{α} -Fmoc protegidos, nas condições instrumentais disponíveis, não se revelou fiável. Deste modo, não se alterando tais condições, será preferível acoplar o aminoácido N -terminal Fmoc protegido de um péptido por via manual, caso se pretenda garantir que esse péptido seja obtido na forma N^{α} -Fmoc protegida.

4.2. Síntese dos péptidos-alvo

4.2.1. Elongamento das cadeias peptídicas por SPPS manual

A síntese dos quatro péptidos-alvo (Tabela 4) foi seguidamente abordada, completando-se as respetivas sequências por SPPS manual sobre porções da peptidil-resina onde havia sido previamente construída a sequência 20AA, comum àqueles péptidos (ver secção 4.1). A escolha da via manual para completar as quatro sequências-alvo teve por base o facto de três dessas sequências conterem resíduos de sulfo-tirosina, cuja estabilidade às condições de síntese assistida por micro-ondas não se encontrou descrita na literatura. Assim, optou-se por uma abordagem cautelosa, ainda que se tenha considerado interessante abordar mais tarde a síntese do péptido dissulfatado, ^{9,12}sTyr-TTI, também pela via automatizada assistida por micro-ondas, para comparação (ver secção 4.4).

A construção das sequências peptídicas finais foi realizada de acordo com os métodos correntes de SPPS, segundo o esquema de proteção ortogonal Fmoc/^tBu, já descritos em secções anteriores. No caso dos péptidos sulfatados, optou-se pela incorporação direta de resíduos de sulfotirosina (**sTyr**, **sY**) protegida lateralmente com o grupo neopentilo [**sTyr(nP)**, **Y(nP)**]. No entanto, como já mencionado em 1.2.2, o grupo nP não é removido nas condições habituais de clivagem e desproteção total de péptidos por acidólise com TFA, pelo que esta operação conduz aos péptidos com os resíduos de sTyr ainda protegidos, ou seja, sob a forma de **sTyr(nP)**, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Sequências e massas molares dos péptidos-alvo, na forma totalmente desprotegida e na forma contendo o(s) resíduo(s) de sTyr ainda protegido(s) com o grupo nP.

Péptido	Sequência	Massa Molar/ g.mol ⁻¹
TTI	GEPGAPID ⁹ YDE ¹² YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3369
¹² sTyr(nP)-TTI	GEPGAPID ⁹ YDE ¹² sY(nP) YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3519
¹² sTyr-TTI	GEPGAPID ⁹ YDE ¹² sY YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3448
⁹ sTyr(nP)-TTI	GEPGAPID ⁹ sY(nP) DE ¹² YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3519
⁹ sTyr-TTI	GEPGAPID ⁹ sY DE ¹² YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3448
^{9,12} sTyr(nP)-TTI	GEPGAPID ⁹ sY(nP) DE ¹² sY(nP) YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3669
^{9,12} sTyr-TTI	GEPGAPID ⁹ sY DE ¹² sY YGDSSEEVGGTPLHEIPGIRL	3528

Por outro lado, como referido no Capítulo 1, uma exposição a condições ácidas fortes ou prolongadas poderá conduzir à perda dos grupos sulfato. Assim, os procedimentos de clivagem, desproteção total e purificação não foram idênticos para todos os péptidos-alvo, tendo sido necessária a otimização de condições experimentais para a obtenção dos sulfo-péptidos desejados, conforme se descreve em seguida.

4.2.2. Clivagem das peptidil-resinas por acidólise com TFA

4.2.2.1. Péptido TTI

Terminado o alongamento da sequência do péptido TTI, procedeu-se à clivagem da peptidil-resina nas condições habitualmente usadas no laboratório, descritas na secção 3.6.1. Assim, deixou-se a peptidil-resina reagir com um “cocktail” de clivagem constituído por TFA (95%), TIS (2,5%) e H₂O (2,5%), procedendo-se depois à filtração da suspensão, obtendo-se o péptido bruto dissolvido no filtrado. Após o tratamento adequado de precipitação e lavagem (ver secção 3.6.1.), uma pequena amostra do péptido bruto foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 10%, para análise por HPLC e espetrometria de massa, sendo o restante armazenado em exsiccador de vácuo até novo uso.

O cromatograma e o espectro de massa do produto bruto, respetivamente apresentados nas Figuras 9 e 10, mostram que o péptido-alvo foi obtido com sucesso, ainda que requerendo purificação adicional. Assim, o pico principal do produto bruto, que apresentou um t_r de 14,3 minutos (Figura 9), pode ser associado ao péptido-alvo, uma vez que os dois picos mais intensos do respetivo espectro de massa (Figura 10) surgiram a valores de m/z compatíveis com os adutos di- e tri-protonado do TTI (Tabela 5).

Tabela 5: Adutos protonados do péptido TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[P + 2H]^{2+}$	1684,80	1684,93
$[P + 3H]^{3+}$	1123,53	1123,93

Assim, concluiu-se que o péptido TTI foi obtido com sucesso por aplicação de metodologias correntes em SPPS com um rendimento de 28,6%, com dados espectroscópicos adequados.

Foi necessário proceder à sua purificação (ver secção 4.4.), dado ser requerido um grau de pureza mínimo de 95% para a realização dos estudos estruturais previstos, por aplicação de cristalografia por difração de raios-X (ver 2).

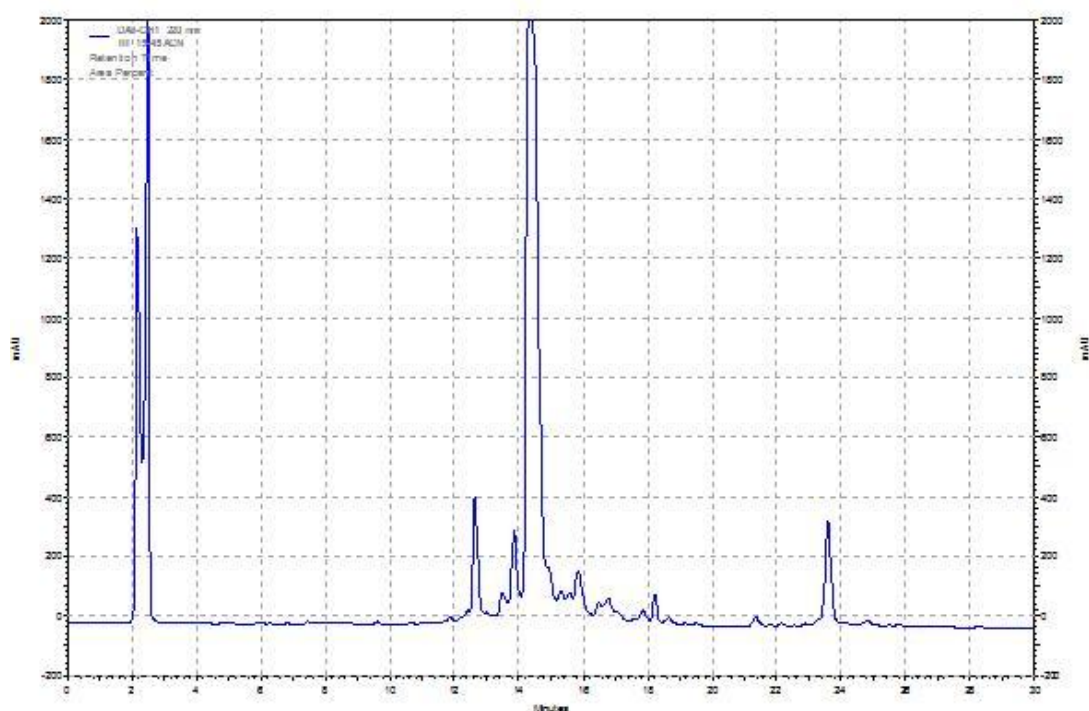


Figura 9: Cromatograma do péptido TTI, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C₁₈, usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

NVTI #508-528 RT: 12.78-13.27 AV: 21 NL: 3.37E
T: + p ESI Full ms [250,00-2000,00]

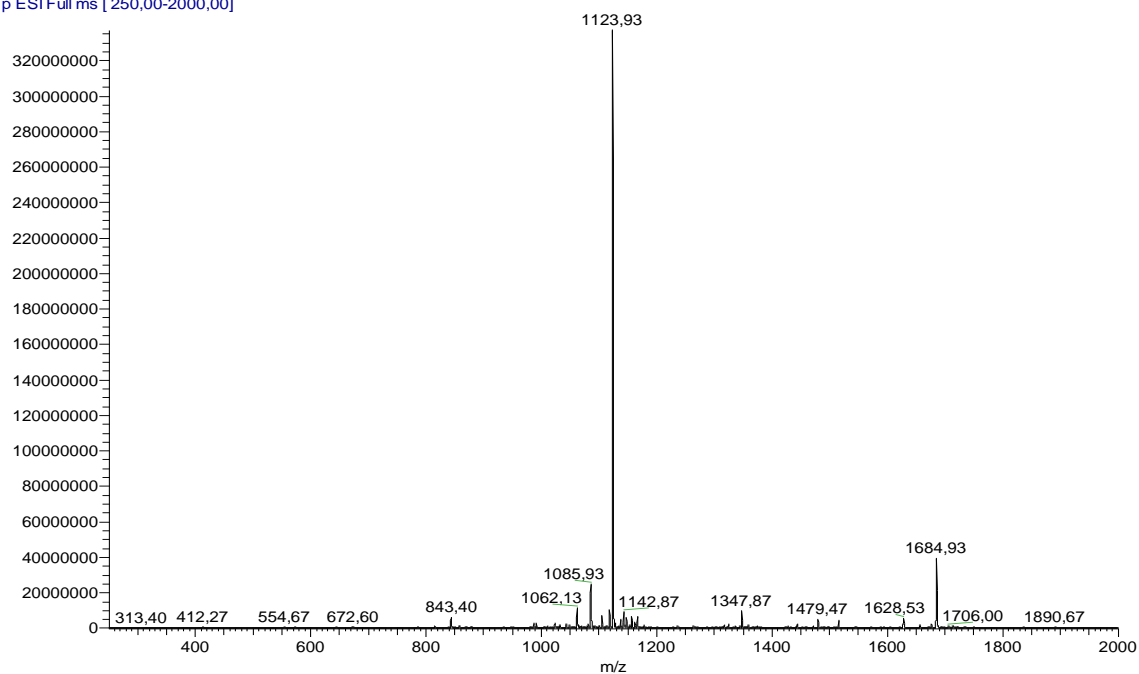


Figura 10: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do péptido TTI.

4.2.2.2. Péptido $^{12}\text{sTyr(nP)}$ -TTI

Uma vez concluída a construção da cadeia peptídica, dividiu-se a peptidil-resina em frações, de modo a estudar-se a influência do procedimento de clivagem na qualidade do produto bruto final. Assim, tendo por base o método de clivagem com TFA, atrás referido, foram testados os procedimentos descritos nas secções 3.6.1. e 3.6.2., que diferem basicamente no momento em que se induz a precipitação do péptido: antes ou depois da remoção da resina do seio da mistura de clivagem, por filtração sob vácuo. O interesse na comparação dos dois procedimentos surgiu do avanço da hipótese que a indução da precipitação do péptido apenas após separação da resina (procedimento 3.6.1.) poderia aumentar o risco de de-sulfatação, por acréscimo do tempo de “residência” do péptido em solução de TFA.

Nas figuras 11 e 12 mostram-se os cromatogramas dos produtos brutos obtidos nos dois casos, ou seja, por precipitação do péptido, respetivamente, após (procedimento 3.6.1.) e antes (procedimento 3.6.2.) a remoção da resina por filtração. Como se pode verificar, ambos os cromatogramas evidenciam a presença de dois componentes maioritários, A e B, não havendo uma diferença muito significativa na sua proporção relativa. Assim, optou-se por aplicar posteriormente o procedimento 3.6.1., previamente estabelecido no grupo como conducente a melhores rendimentos.

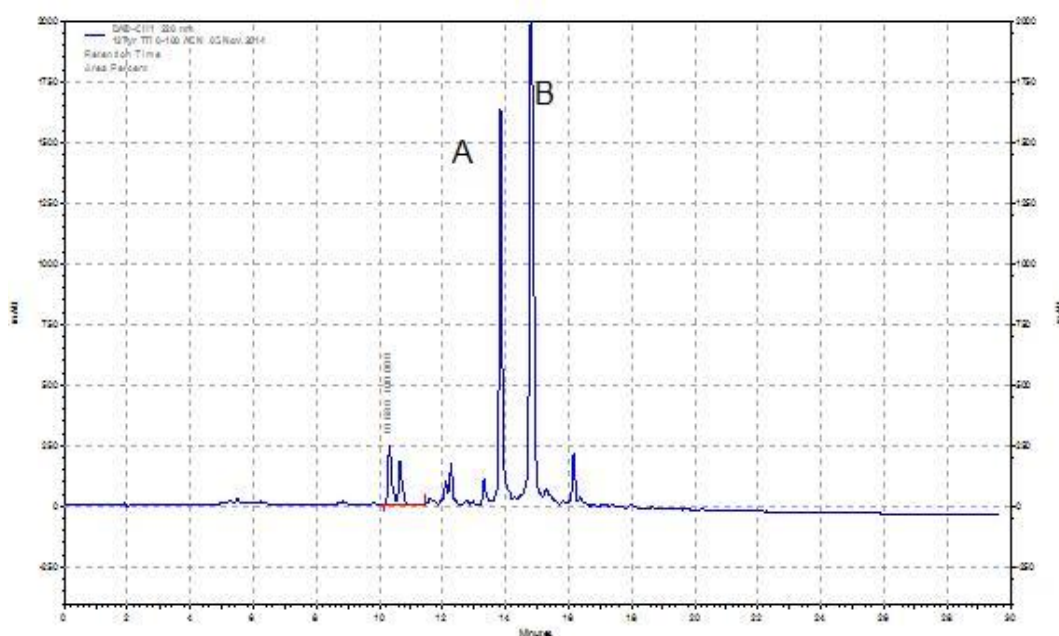


Figura 11: Cromatograma do péptido bruto $^{12}\text{sTyr(nP)}$ -TTI, obtido por clivagem de acordo com o procedimento descrito em 3.6.1. Análise realizada em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

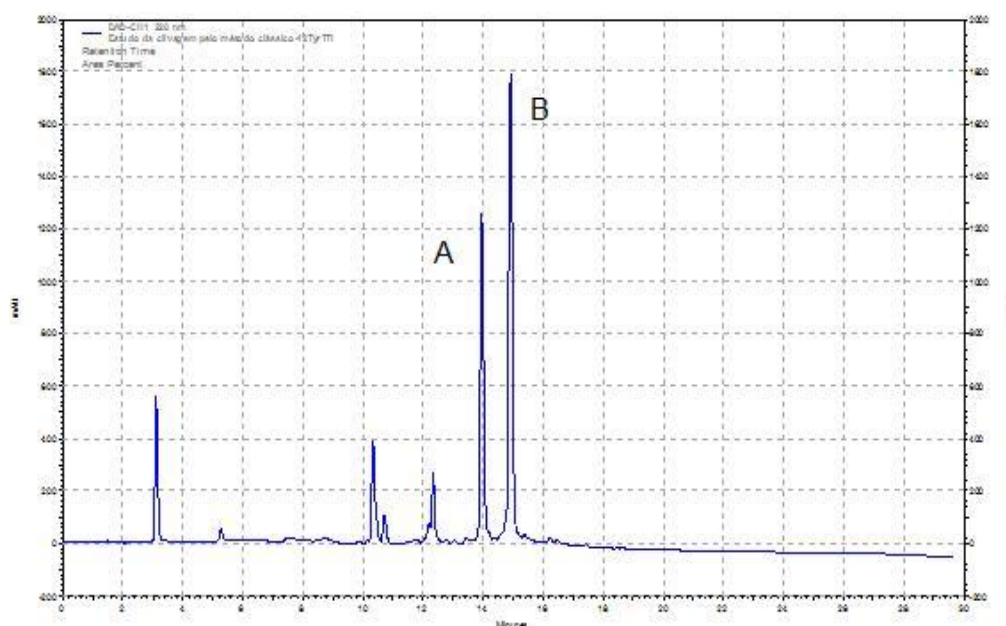


Figura 12: Cromatograma do péptido bruto $^{12}\text{sTyr(nP)-TTI}$, obtido por clivagem de acordo com o procedimento descrito em 3.6.2. Análise realizada em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com detecção a $\lambda=220\text{ nm}$.

A análise dos produtos brutos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa permitiu confirmar que ambos tinham composição idêntica, em que o componente A ($t_r=14,0$ minutos) evidenciou um espectro de massa (Figura 13) cujo pico-base apresentou um valor de m/z de compatível com o aduto triprotonado ($[\text{P}+3\text{H}]^{3+}$) do péptido esperado, $^{12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ (Tabela 6). No que diz respeito ao componente maioritário B ($t_r=15,0$ minutos), a sua análise por espectrometria de massa (dados não mostrados) não foi conclusiva, dado que o pico-base surgiu a um valor de m/z (1474 u.m.a) não compatível com produtos secundários eventualmente expectáveis neste tipo de síntese; nomeadamente, péptidos de deleção (falta de um ou mais aminoácidos na sequência), ou os péptidos $^{12}\text{sTyr-TTI}$ (resultante da perda do grupo nP) e TTI (resultante da perda total do sulfato protegido).

NVEstudo12Tyr #580-600 RT: 14,48-14,97 AV: 21
T: + p ESI Full ms [250,00-2000,00]

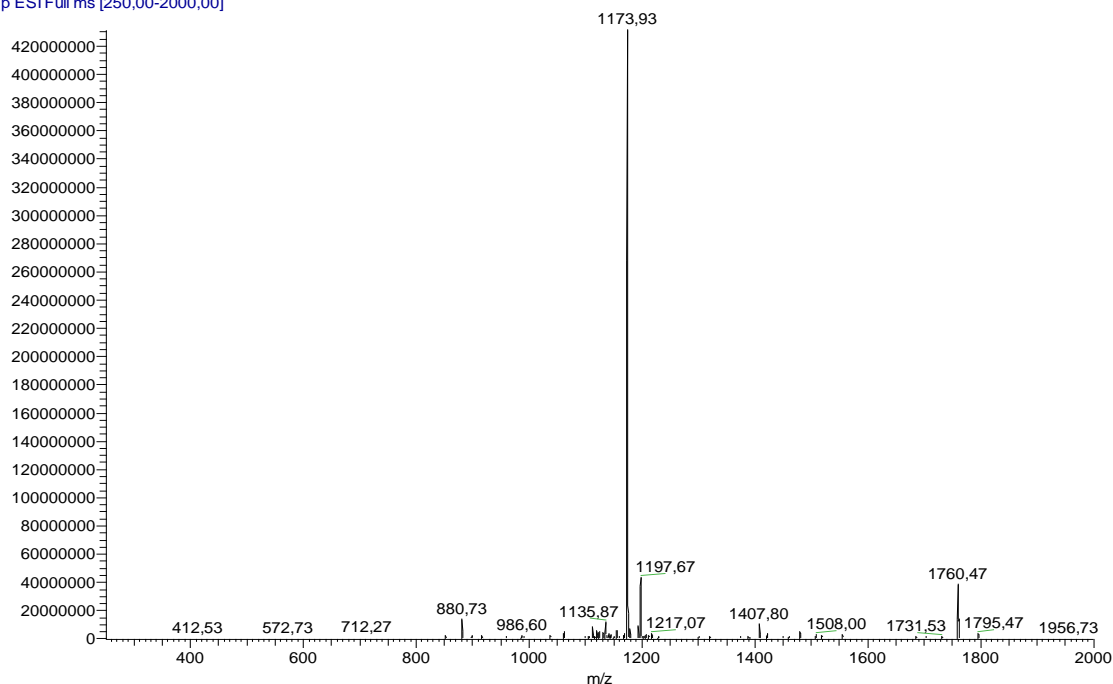


Figura 13: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=14,0$ minutos, ver Figuras 11 e 12) do produto bruto de síntese do péptido $^{12}\text{sTyr}(\text{nP})\text{-TTI}$.

Tabela 6: Adutos protonados do péptido $^{12}\text{sTyr}(\text{nP})\text{-TTI}$, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1759,90	1760,47
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1173,27	1173,93

Admitindo-se que a impureza B se havia formado no decurso da clivagem, abordou-se ainda a realização desta reação a baixa temperatura (0°C), com base em trabalhos anteriormente descritos na literatura [38]. No entanto, a quantidade de péptido bruto que se conseguiu isolar foi quase vestigial, pelo que se abandonou este procedimento.

Apesar da qualidade do produto bruto obtido se ter revelado inferior à esperada, dado o componente maioritário não corresponder ao péptido-alvo, a presença deste como segundo componente mais importante e o elevado custo da Fmoc-sTyr(nP)-OH usada na síntese dos péptidos sulfatados, fizeram com que se optasse por prosseguir para a etapa de remoção do grupo nP (secção 4.3.).

4.2.2.3. Péptido $^9\text{sTyr(nP)}$ -TTI

Realizou-se a clivagem da peptidil-resina nas condições descritas em 3.6.1., tendo-se dissolvido uma pequena amostra do produto bruto isolado em água, para análise por HPLC e por espetrometria de massa. Como se pode ver na Figura 14, o perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao anteriormente observado na síntese do péptido $^{12}\text{sTyr(nP)}$ -TTI (Figuras 11 e 12). Ou seja, obteve-se um produto bruto de composição inesperadamente complexa, cujos dois componentes predominantes, A e B, apresentaram tempos de retenção de 14.0 e 14.5 minutos. A análise destes componentes por espetrometria de massa permitiu concluir que o componente A corresponde ao péptido-alvo (Figura 15), uma vez que o pico-base foi detetado a um valor de m/z compatível com o aduto triprotonado da sequência $^9\text{sTyr(nP)}$ -TTI (Tabela 7).

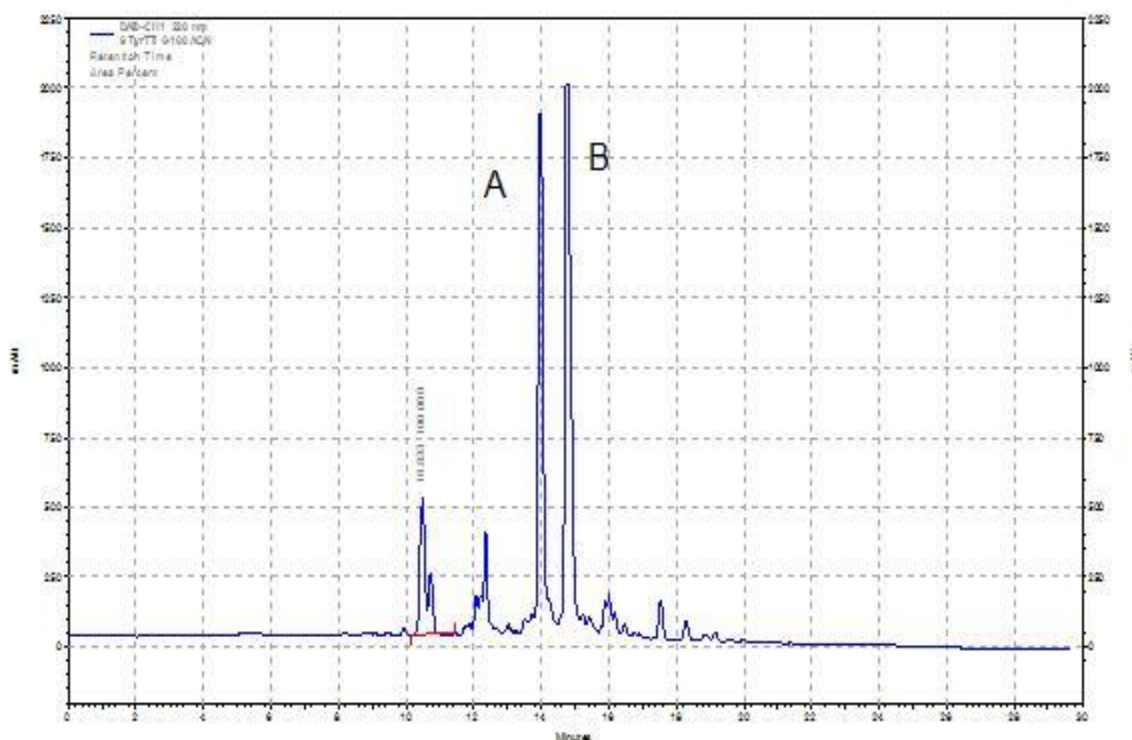


Figura 14: Cromatograma do péptido $^9\text{sTyr(nP)}$ -TTI, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

NV9TyrTTI #240-250 RT: 11,24-11,69 AV: 11 NL: 1,00E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

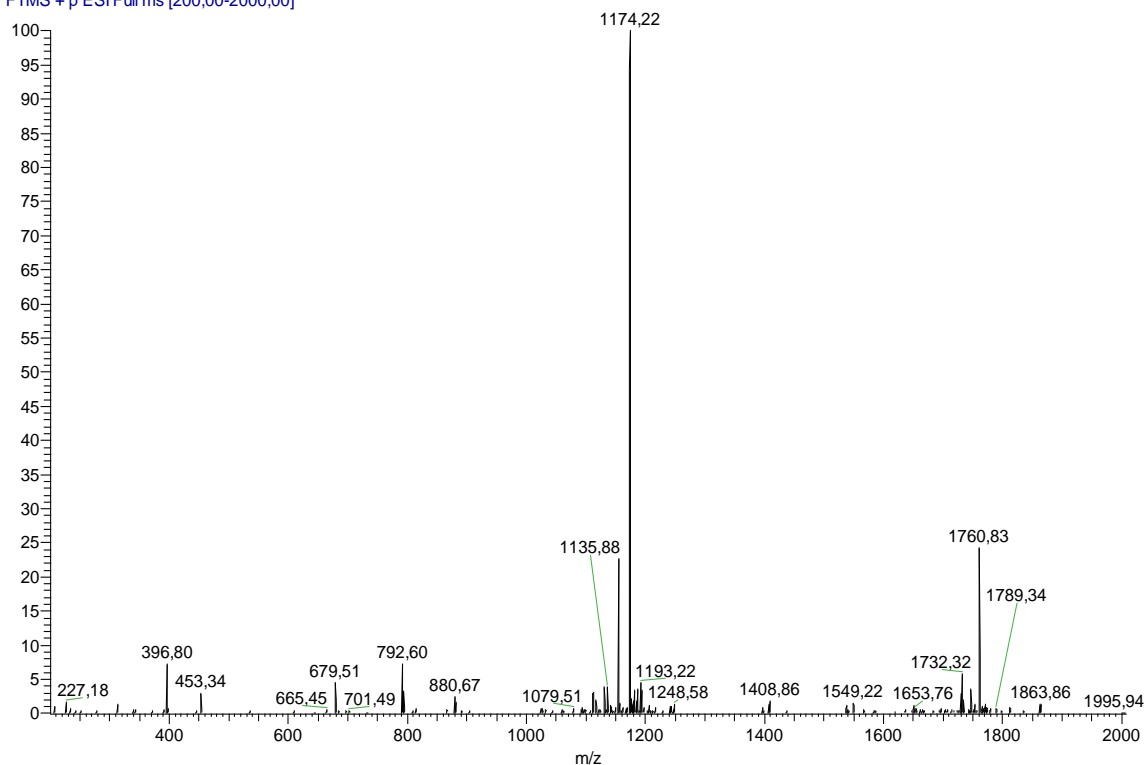


Figura 15: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=14,0$ minutos, ver Figura 14) do produto bruto de síntese do péptido $^9\text{sTyr(nP)-TTI}$.

Tabela 7: Adutos protonados do péptido $^9\text{sTyr(nP)-TTI}$, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1759,90	1760,83
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1173,27	1174,22

A análise do componente B por espetrometria de massa (dados não mostrados) revelou-se novamente inconclusiva. Tal como no caso anterior (4.2.2.2.), e pelos mesmos motivos, decidiu-se prosseguir com o produto bruto para a fase seguinte, ou seja, remoção do grupo nP (ver secção 4.3).

4.2.2.4. Péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$

A clivagem e isolamento do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ foram realizados de acordo com o procedimento descrito em 3.6.1. e, tal como descrito para os péptidos anteriores, dissolveu-se uma pequena amostra do produto isolado em água, para análise por HPLC e espetrometria de massa. Como se pode ver na Figura 16, o perfil cromatográfico obtido tornou evidente a má qualidade do produto bruto obtido, obtendo-se uma composição complexa com três componentes predominantes, B, C e A com tempos de retenção 14.1 minutos, 14.3 minutos e 16 minutos, respetivamente. A análise por espetrometria de massa destes componentes permite concluir que o péptido-alvo pretendido corresponde ao componente A, visto que o pico-base apresentou um valor de m/z de compatível com o aduto triprotonado ($[\text{P}+3\text{H}]^{3+}$) (Figura 17). O componente B foi identificado como sendo um produto secundário expectável neste tipo de síntese, nomeadamente a perda de um grupo neopentilo num dos sulfatos, pois a análise por espetrometria de massa da figura 18 permitiu identificar que o pico-base apresenta um valor de m/z de compatível com o aduto triprotonado da vertente monossulfatada desprotegida do TTI (Tabela 8). No que diz respeito ao componente C ($t_r = 14.3$ minutos), a sua análise por espetrometria de massa (Figura 19) não foi conclusiva, pois o pico-base surge a um valor de m/z (1200 u.m.a) que não se conseguiu atribuir a produtos secundários expectáveis.

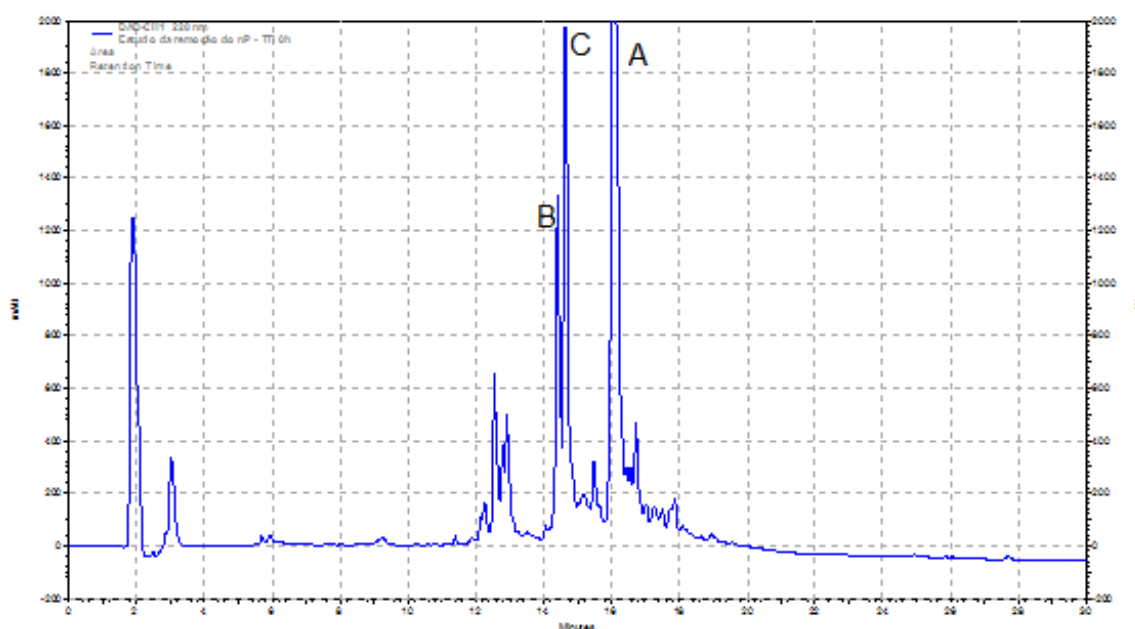


Figura 16: Cromatograma do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$, obtido em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda = 220$ nm.

Nv_9-12_TyrTTI #288-304 RT: 13,36-14,05 AV: 17 NL: 6,50E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

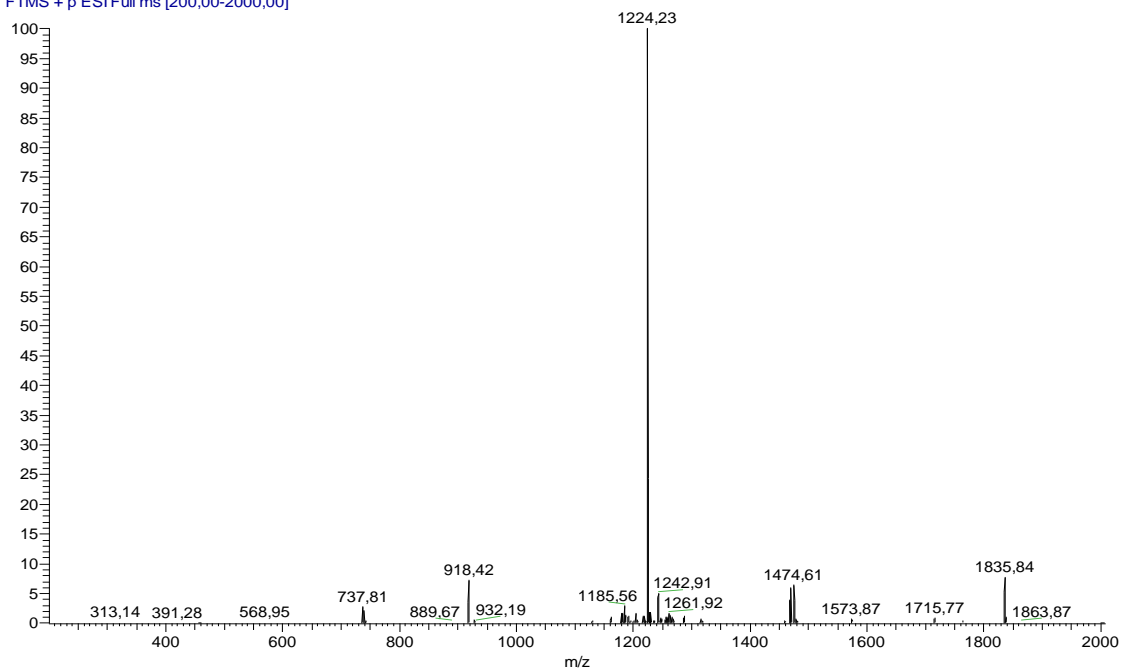


Figura 17: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=16$ minutos, ver Figura 16) do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$.

Apesar da qualidade do produto bruto ter sido inferior à esperada, como o componente maioritário correspondeu ao péptido-alvo, optou-se por prosseguir para os estudos da remoção do grupo neopentilo (secção 4.3).

Tabela 8: Adutos protonados do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1834,99	1835,84
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1223,33	1224,23

Nv_9-12_TyrTTI #255-263 RT: 11,91-12,26 AV: 9 NL: 1,71E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

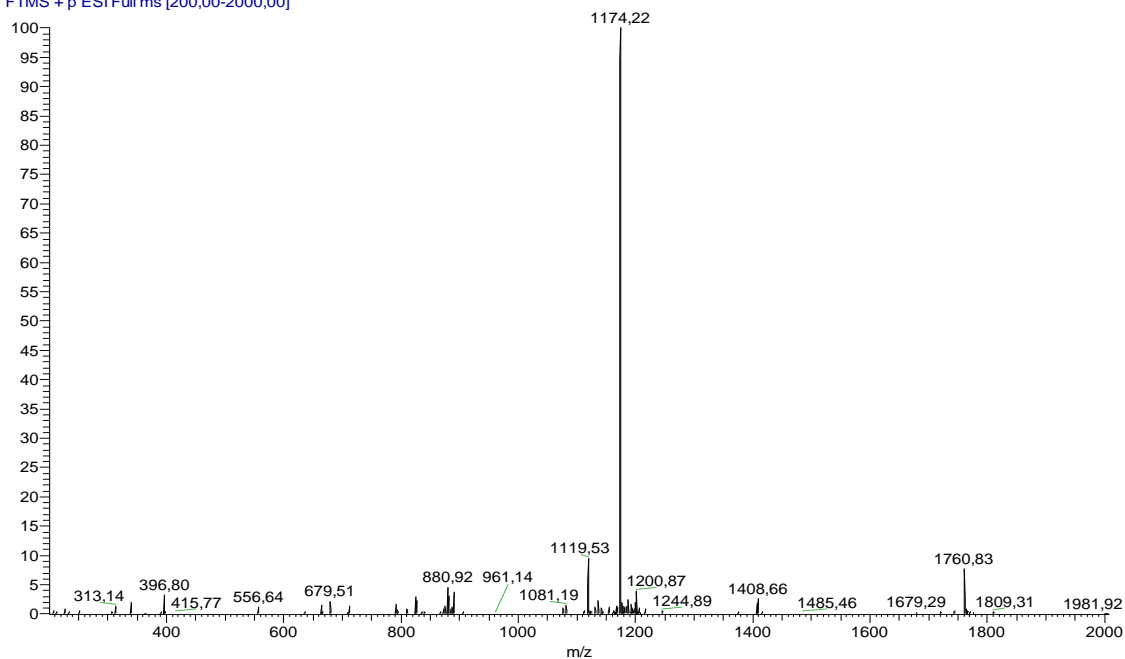


Figura 18: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B ($t_r=14,1$ minutos, ver Figura 16) do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$.

Nv_9-12_TyrTTI #266-280 RT: 12,40-13,01 AV: 15 NL: 7,86E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

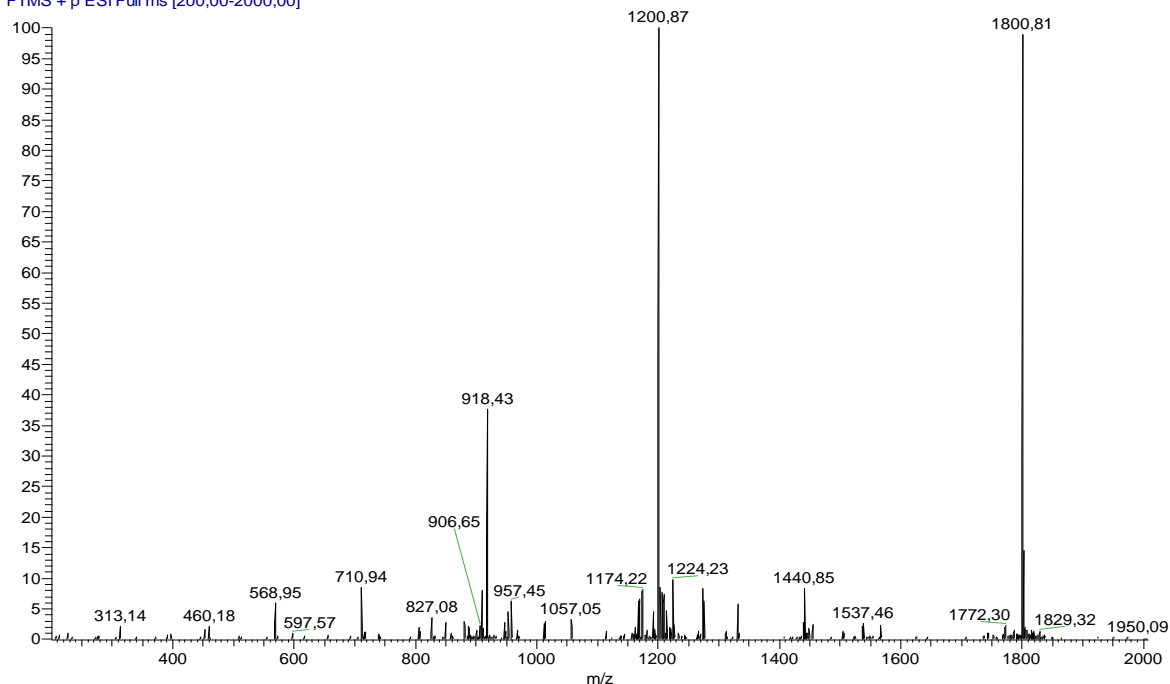


Figura 19: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C ($t_r=14,3$ minutos, ver Figura 16) do produto bruto de síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$.

4.3. Remoção do grupo neopentilo

4.3.1. Péptidos $^{12}\text{sTyr-TTI}$ e $^9\text{sTyr-TTI}$

A remoção do grupo neopentilo dos péptidos monosulfatados impuros, $^{12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ e $^9\text{sTyr-TTI}$, foi abordada nas condições apresentadas na secção 3.7.1., tendo por base procedimentos descritos na literatura [42]. Para tal, dissolveu-se o péptido bruto na menor quantidade possível de água e adicionou-se acetato de amónio de modo a obter-se uma concentração final de 1,5 M. De seguida, deixou-se a solução a 37 °C sob agitação magnética, monitorizando-se o progresso da reação por HPLC (dados não apresentados).

A remoção completa do grupo nP do péptido $^{12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro requereu 4,5 horas de reação, obtendo-se um produto cujo perfil cromatográfico se apresenta na Figura 20. Como se pode verificar, por comparação com os cromatogramas anteriormente mostrados nas Figuras 11 e 12, houve desaparecimento dos componentes originais do péptido bruto (A e B), dando lugar ao surgimento de novos produtos, A' ($t_r=12,1$ minutos) e B' ($t_r=10,2$ minutos), Figura 20.

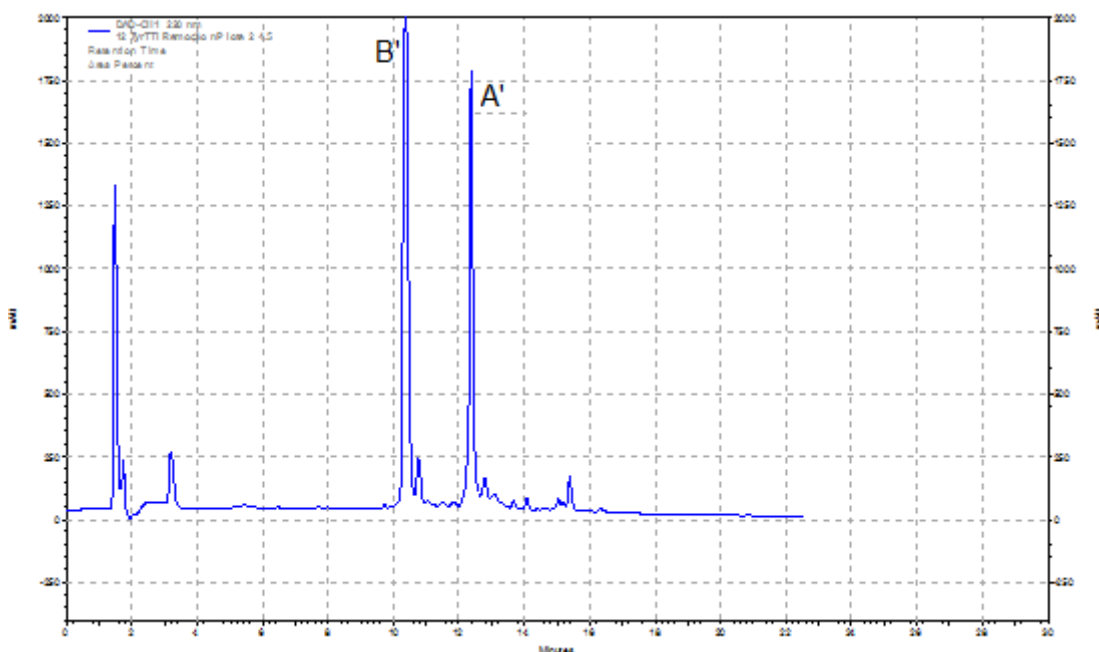


Figura 20: Cromatograma do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao péptido $^{12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

A análise do produto bruto de desproteção, por cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa, permitiu identificar o componente A' como sendo o péptido-alvo, $^{12}\text{sTyr-TTI}$, cujo espectro de massa (Figura 21) evidenciou o pico-base a um valor de m/z compatível com o aduto diprotonado do péptido, a m/z 1725,35 u.m.a. observando-se também a presença do aduto triprotonado, a m/z 1150,27 u.m.a. (Tabela 9).

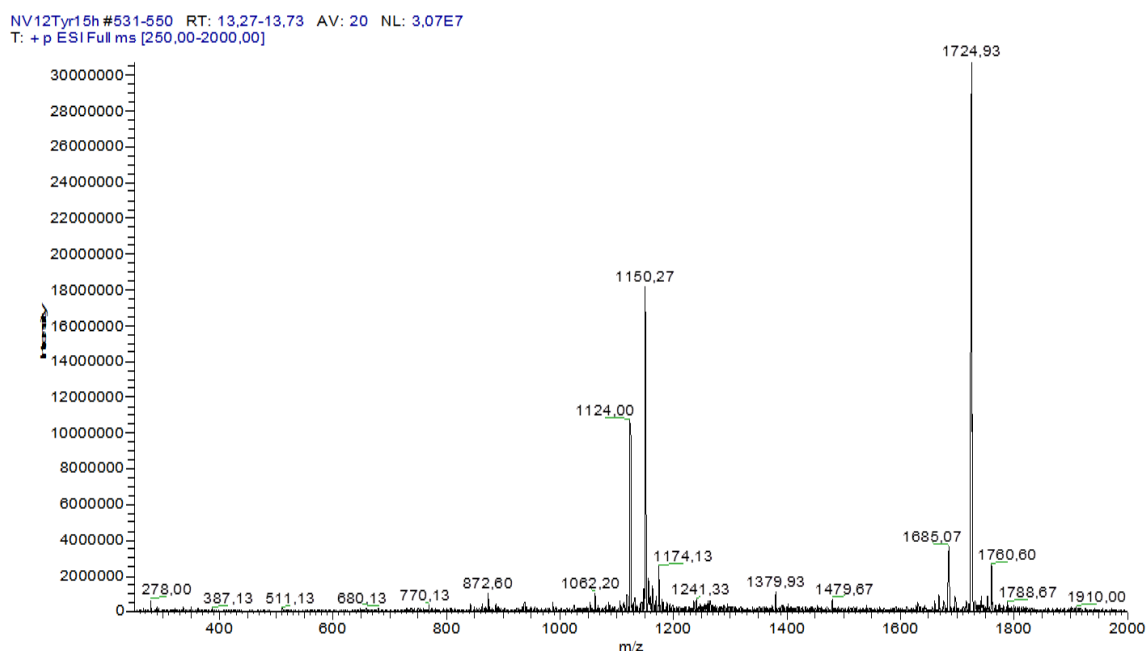


Figura 21: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=12,1$ minutos, ver Figura 20) do produto bruto de síntese do péptido $^{12}\text{sTyr-TTI}$.

Tabela 9: Adutos protonados do péptido $^{12}\text{sTyr-TTI}$, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1725,35	1724,93
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1150,53	1150,27

De forma idêntica, logrou-se remover o grupo nP no péptido $^9\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro, sendo neste caso necessárias 5,5 horas para que tal remoção fosse completa. O perfil cromatográfico do produto bruto de desproteção encontra-se reproduzido na Figura 22, sendo novamente possível confirmar, por comparação com o cromatograma apresentado na Figura 14, o desaparecimento dos componentes iniciais (A e B),

acompanhado do surgimento dos novos produtos A' ($t_r=12,2$ minutos) e B' ($t_r=10,2$ minutos).

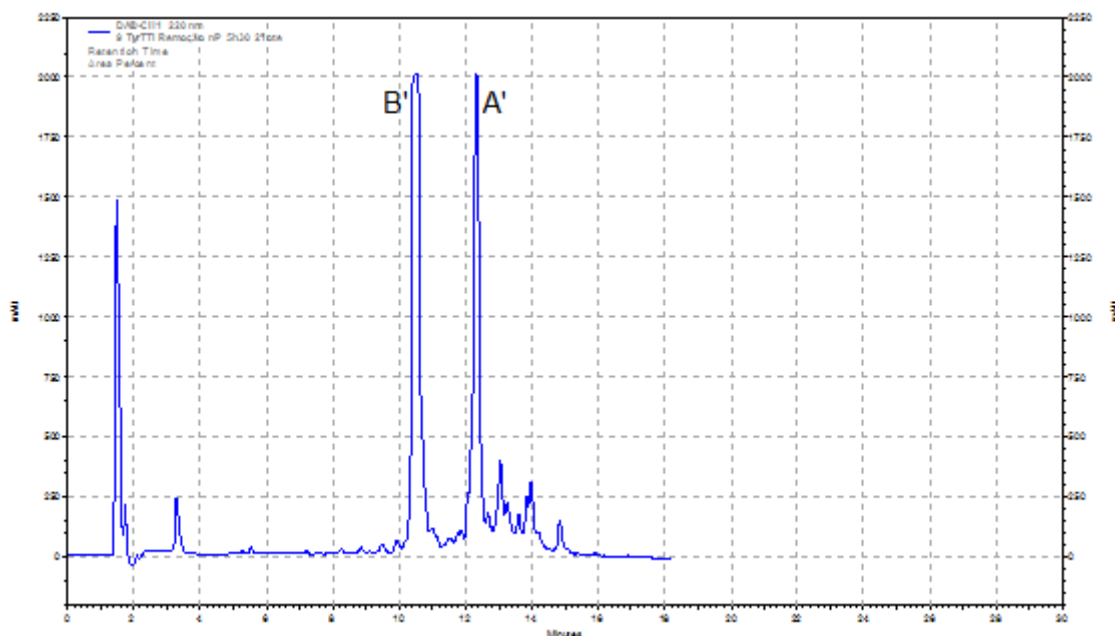


Figura 22. Cromatograma do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao péptido $^9\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

Tal como observado para o outro isómero monossulfatado, foi possível identificar o produto A' como sendo o péptido-alvo, $^9\text{sTyr-TTI}$, cujo espetro de massa (Figura 23) revela picos a valores de m/z compatíveis com os adutos di- e triprotonados (Tabela 10) deste péptido.

Tabela 10: Adutos protonados do péptido $^9\text{sTyr-TTI}$, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1725,35	1725,79
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1150,53	1150,86

NV9TyrTTI #217-223 RT: 10,20-10,46 AV: 7 NL: 1,42E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

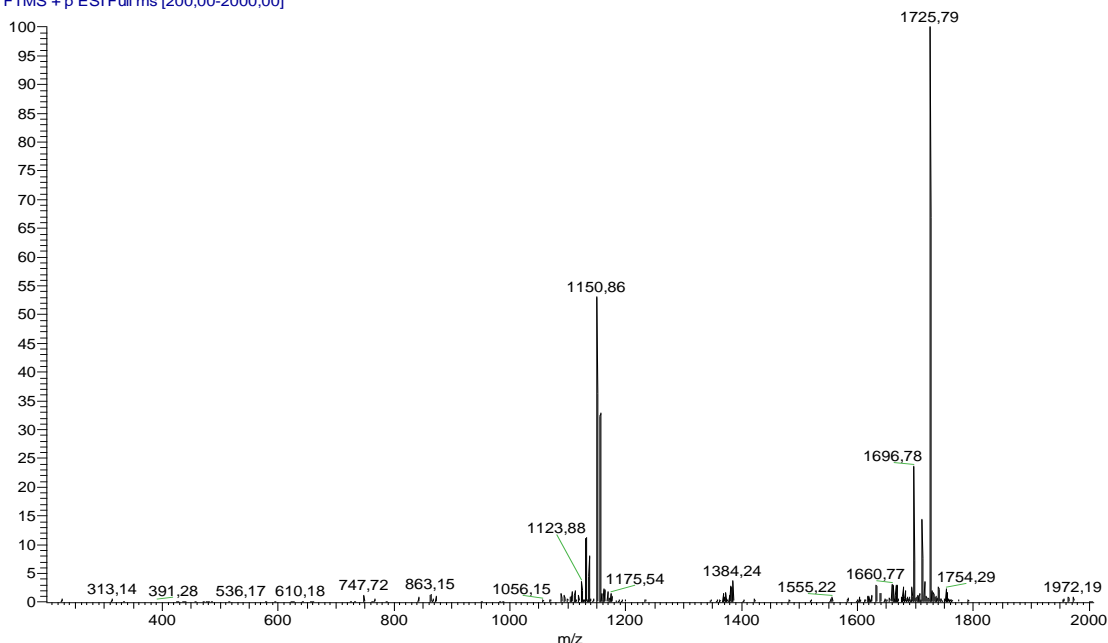


Figura 23: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=12,2$ minutos, ver Figura 22) do produto bruto de síntese do péptido $^9\text{sTyr-TTI}$.

Como se pode constatar dos perfis cromatográficos dos dois isómeros monossulfatados, foi necessário proceder à sua purificação, conforme se descreve na Secção 4.4. O rendimento do isómero $^{12}\text{sTyr-TTI}$ foi de 10,9%, enquanto que, para o isómero $^9\text{sTyr-TTI}$ foi de 8,9%.

4.3.2. Péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$

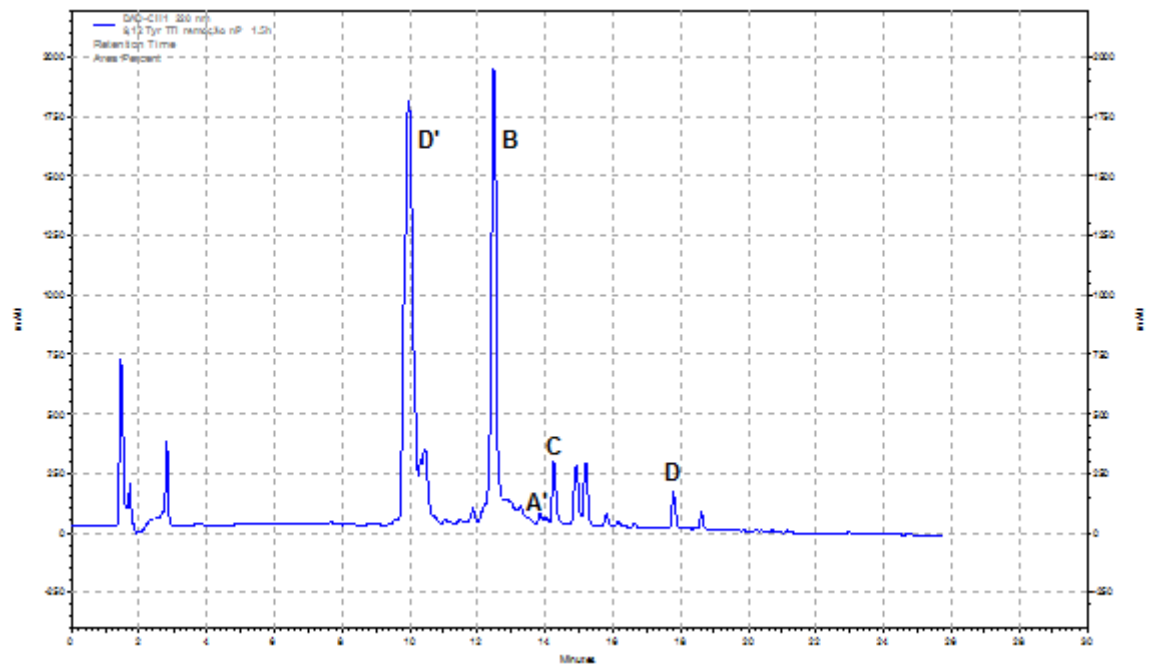
Na sequência dos problemas (perda de um grupo nP num dos sulfatos) de estabilidade dos resíduos de tirosina sulfatada associados ao derivado dissulfatado (ver secção 4.2.2.4.), foram testadas diferentes condições de aplicação do método do acetato de amónio referido na secção anterior e descrito na secção 3.7.1. Nomeadamente, foram variados parâmetros experimentais como o solvente para solubilização inicial do péptido protegido (acetonitrilo *versus* água), a concentração final de acetato de amónio (2, 1,5 e 1 M), a temperatura, o tempo de reação ou o modo de agitação, conforme se apresenta na Tabela 11.

Tabela 11. Condições experimentais testadas no estudo da remoção do grupo nP do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$, pelo método do acetato de amónio.

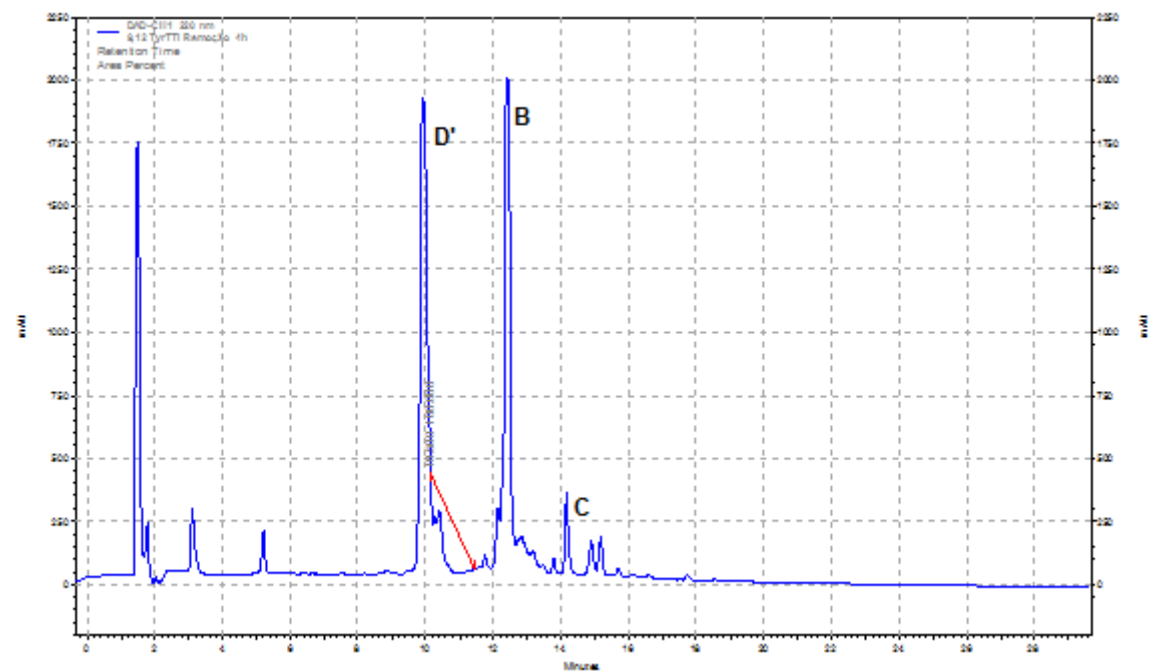
Concentração de Acetato de amónio (M)	Temperatura	Tipo de agitação, r.p.m	Tempo	Solvente	Figura
1,5	37°C	Magnética, 330	1,5 h	Acetonitrilo	24 A.
1,5	37°C	Magnética, 330	4 h	Água	24 B.
1,5	37 °C	Sem agitação	2 h	Água	24 C.
2	37°C	Magnética, 330	20 h	Acetonitrilo	25 A.
1,5	37°C	Orbital, 330	18 h	Água	25 B.
1,0	30°C	Magnética, 330	24 h	Água	25 C.

Em todas as reações testadas, monitorizou-se o progresso das mesmas por HPLC (dados não apresentados). O conjunto de cromatogramas representados nas figuras 24 A-C revela a influência da variação do solvente e da presença/ausência de agitação (ver tabela 11) no resultado do tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com acetato de amónio, visando a remoção seletiva do grupo nP. Como se pode observar, obteve-se, em todos os casos, um perfil cromatográfico bastante complexo, com alguns componentes comuns às diferentes amostras. Comparando com o cromatograma do péptido protegido, apresentado na Figura 16, é notório o surgimento de novos componentes (A', D e D'). A análise dos componentes D e D', com tempos de retenção de, respetivamente, 18,0 e 10,0 minutos, mostrou-se inconclusiva, visto não apresentarem dados de espetrometria de massa compatíveis com produtos secundários expectáveis. Por outro lado, o componente maioritário, B, com $t_r = 12.0$ minutos, foi identificado como sendo o péptido na sua forma nativa (TTI), ou seja, tratando-se do produto secundário resultante da perda total dos grupos sulfato. Foram ainda detetados componentes já presentes no péptido protegido bruto (Figura 16), como sejam o componente C ($t_r = 14.3$ minutos), ou vestígios do próprio péptido protegido. De realçar que o péptido-alvo ($^{9,12}\text{sTyr-TTI}$) foi apenas detetado no produto bruto cujo perfil cromatográfico se apresenta na figura 24 A.

A.



B.



C.

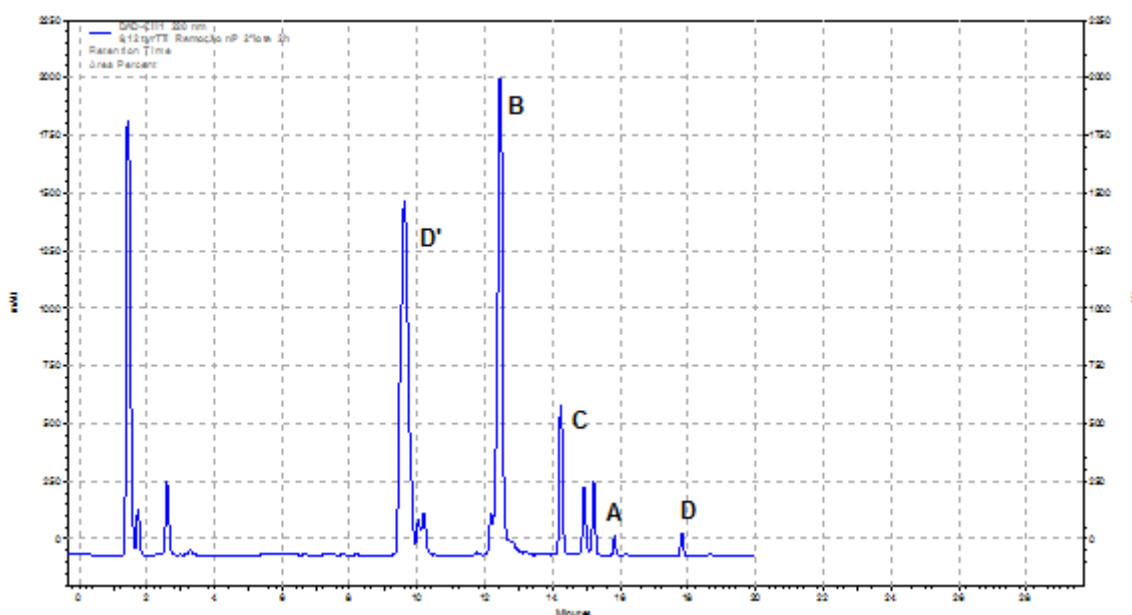
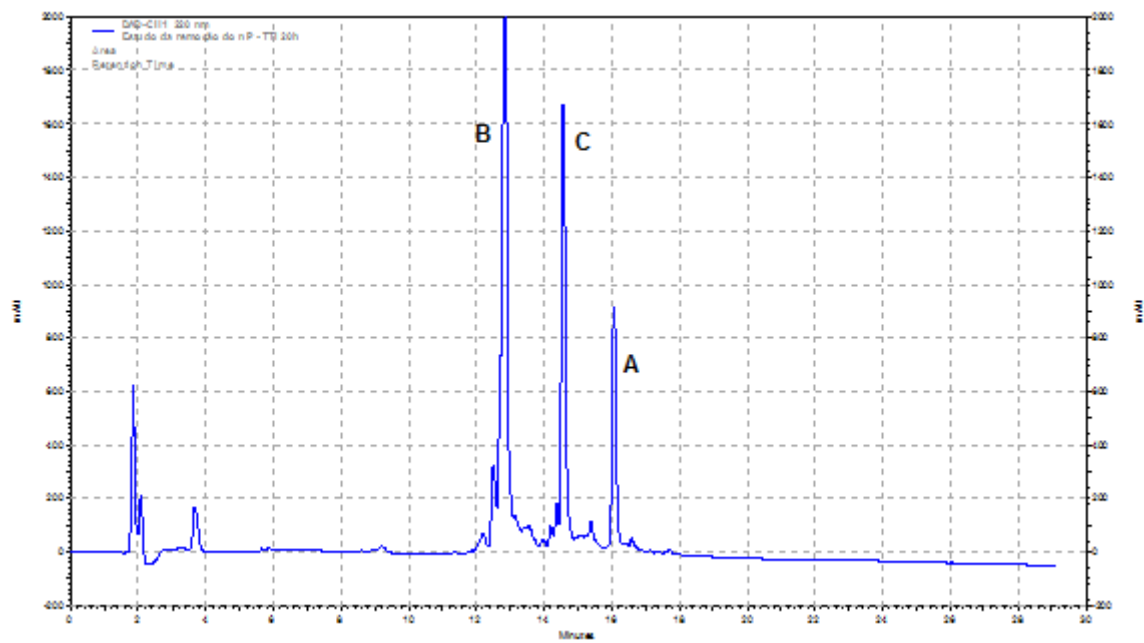


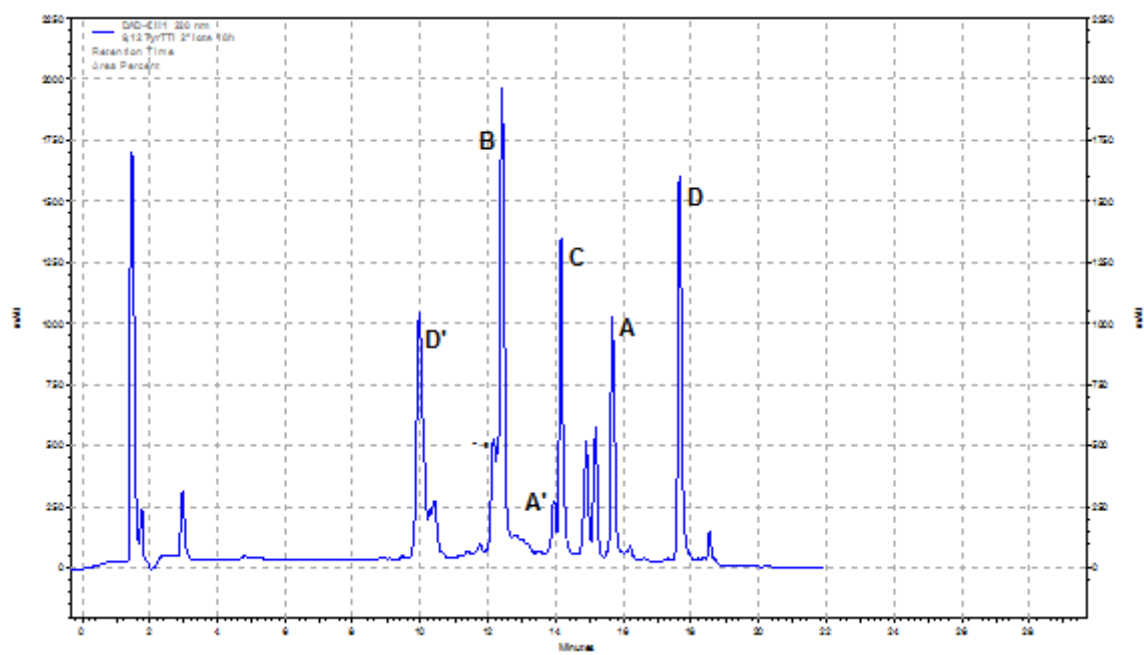
Figura 24: Cromatogramas dos produtos brutos obtidos após aplicação do método de remoção do grupo nP pelo acetato de amónio a 1,5 M e **A.** dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em acetonitrilo; **B.** dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água; **C.** dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água, sem agitação. As análises foram realizadas em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

O conjunto de cromatogramas representados nas figuras 25 A-C revela a influência da concentração do acetato de amónio, da temperatura e do solvente. Pode observar-se novamente que os três estudos apresentam perfis cromatográficos bastante complexos, surgindo novamente o componente B, já identificado como sendo o péptido TTI, como produto maioritário das reações levadas a cabo a 37 °C. Curiosamente, não se detetou a formação de TTI na reação levada a cabo a 30 °C, não se podendo, no entanto, atribuir este resultado ao abaixamento de temperatura efetuado, pois também se usou uma concentração de acetato de amónio inferior à dos outros dois testes, o que não permite tirar uma conclusão definitiva sobre qual o fator preponderante para a ausência de formação de TTI. Novamente, foi detetada a formação dos componentes não identificados C ($t_r=14.3$ minutos), D ($t_r=18,0$ minutos) e D' ($t_r=10,0$ minutos), cujas proporções variaram conforme as condições aplicadas.

A.



B.



C.

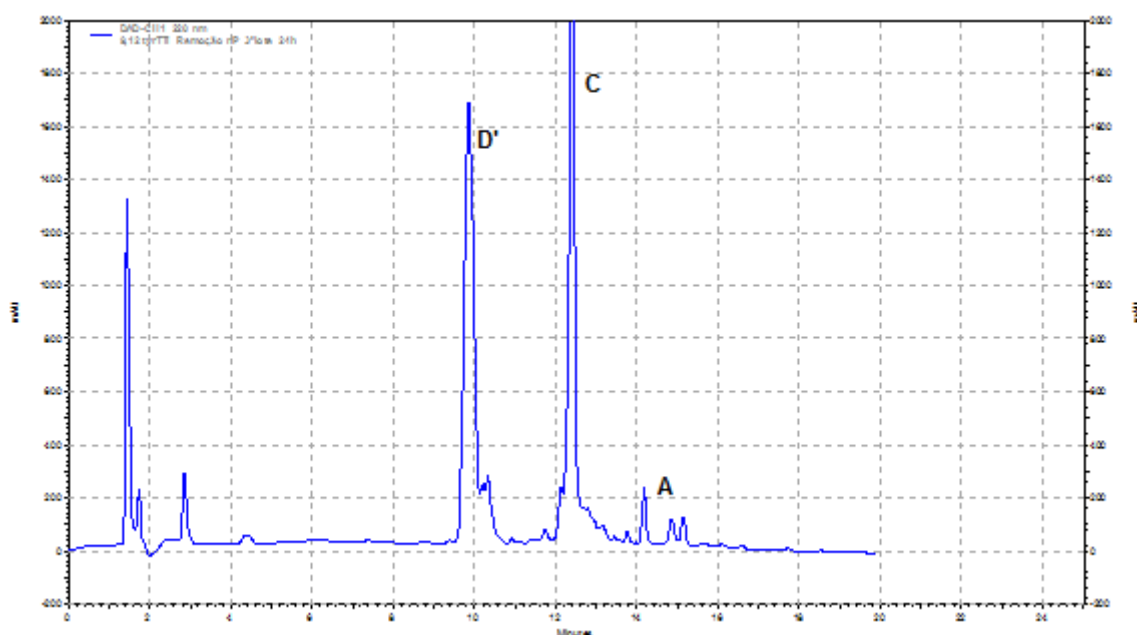


Figura 25: Cromatogramas dos produtos brutos obtidos após aplicação do método de remoção do grupo nP pelo acetato de amónio **A.** a 37 °C e à concentração de 2,0 M, dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em acetonitrilo; **B.** a 37 °C e à concentração de 1,5 M, dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água; **C.** a 30 °C e à concentração de 1,0 M, dissolvendo o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro em água. As análises foram efetuadas em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

Como se pode constatar pelos perfis cromatográficos, nenhuma das condições de reação testadas conduziu a resultados satisfatórios. A remoção dos grupos protetores neopentilo do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ relevou-se um grande desafio, suspeitando-se de ocorrência (não comprovada) de reações secundárias intramoleculares. Assim, de forma a tentar averiguar se o tamanho do péptido teria influência no sucesso da desproteção das duas tirosinas sulfatadas presentes, decidiu-se sintetizar um fragmento mais pequeno, correspondente à sequência central de seis aminoácidos, incluindo as duas tirosinas sulfatadas. Este estudo está apresentado na secção seguinte.

4.3.3. Influência do tamanho do péptido no sucesso da desproteção

Perante as dificuldades experimentadas na desproteção lateral dos resíduos de sulfo-tirosina, substancialmente agravadas no caso do péptido dissulfatado ^{9,12}sTyr-TTI, levantou-se a hipótese da ocorrência de reações secundárias intramoleculares neste péptido, favorecidas pelas condições de remoção dos grupos nP. Assim, decidiu-se sintetizar um fragmento substancialmente mais curto que preservasse as duas sulfo-tirosinas protegidas, para averiguar se as dificuldades anteriormente sentidas seriam ou não minimizadas. Por conseguinte, sintetizou-se manualmente o hexapéptido **DsYDEsYG** (Tabela 12), usando as condições de acoplamento e desproteção descritas na secção 3.1.1.

Tabela 12. Sequências peptídicas derivadas do hexapéptido DsYDEsYG e respetivas massas molares

Péptido-modelo alvo	Sequências possíveis ^[a]	Massa Molar / g.mol ⁻¹
DsYDEsYG	DYDEYG	759
	DsY(nP) DE sY(nP) G	1061
	DsY(nP) DE sY G	990
	DsY DE sY G	919
	DsY(nP) DEYG	910
	DsY DEYG	840

^[a] para além da sequência desejada, consideraram-se outras eventualmente resultantes de perda total dos grupos sulfato, perda parcial dos grupos sulfato, não remoção dos grupos nP, remoção de um só grupo nP, remoção de um só grupo nP acompanhada de dessulfatação.

Após a construção da cadeia peptídica, fez-se a clivagem da peptidil-resina tal como descrito na secção 3.6.1, usando-se um cocktail de clivagem contendo TFA (95%), TIS (2,5%) e H₂O (2,5%). Por aplicação do procedimento habitual de precipitação do péptido clivado, não foi observada a formação de qualquer precipitado, o que se atribuiu a uma maior solubilidade do péptido na fase etérea, dado o seu pequeno tamanho. Ainda assim, decidiu-se repetir o procedimento de clivagem sobre a mesma resina, para garantir que a ausência de precipitado não seria devida a uma baixa extensão da primeira reação de clivagem. Não tendo sido, novamente, observada qualquer precipitação, analisou-se a fase etérea por HPLC, confirmando-se a presença de produtos de clivagem, bastante diluídos (Figura 26). Procedeu-se a uma extração líquido-líquido com água, para remover o material peptídico da fase etérea. O produto bruto assim isolado foi analisado por HPLC, verificando-se novamente que se tratava de uma mistura de vários componentes (Figura 27).

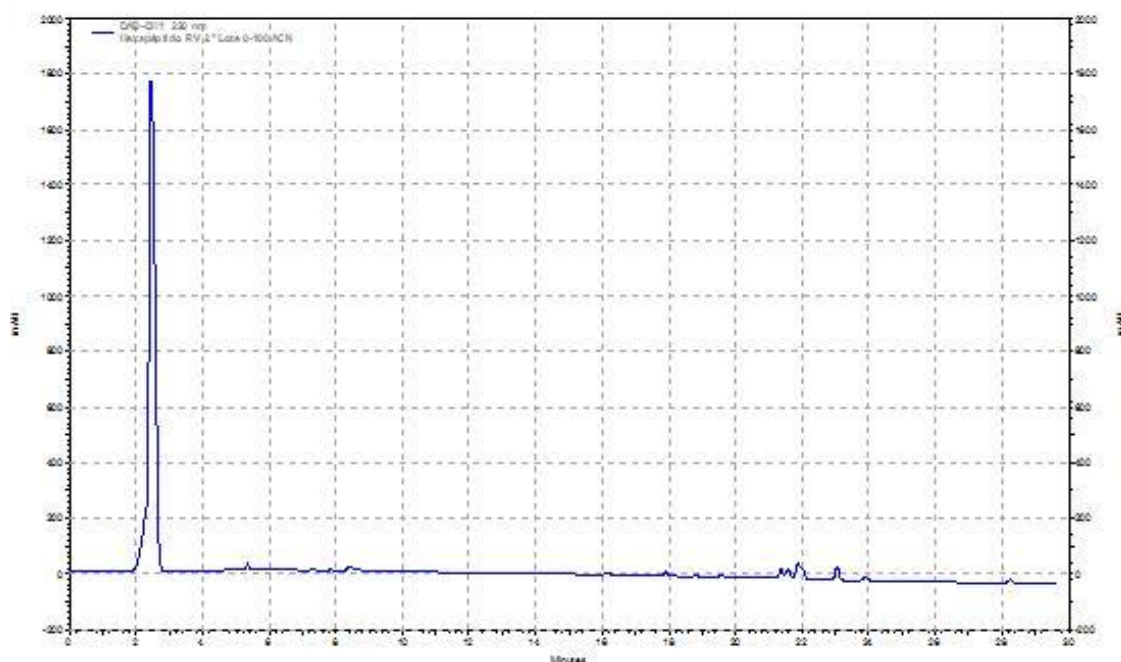


Figura 26: Perfil cromatográfico da fase etérea, após clivagem da peptidil-resina onde havia sido construído o hexapéptido modelo. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com detecção a $\lambda=220$ nm.

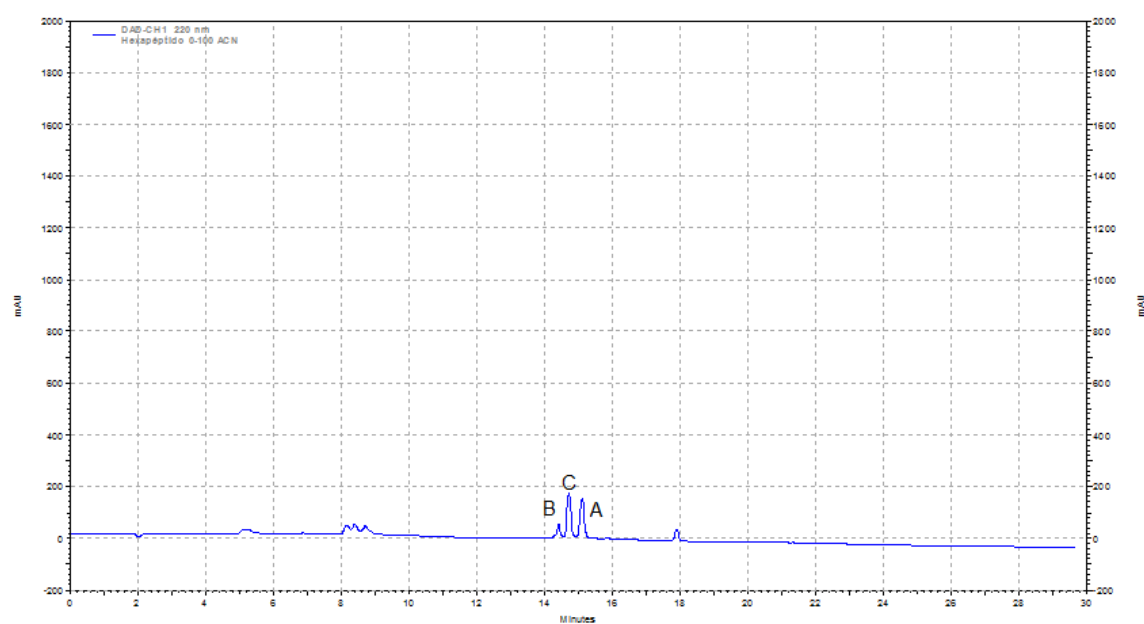


Figura 27: Perfil cromatográfico da fase etérea, após extração líquido-líquido da peptidil-resina onde havia sido construído o hexapéptido modelo. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com detecção a $\lambda=220$ nm.

Realizou-se uma análise da mistura por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, com vista à identificação dos três componentes principais. A

análise realizada permitiu identificar o componente B, com $t_r=14,2$ minutos (Figura 27) como sendo um derivado monossulfatado ainda protegido com o grupo nP (MM=910 g/mol), de acordo com o espectro de massa reproduzido na Figura 28 (pico-base observado a m/z 910,32 u.m.a.). O componente C, com $t_r=14,4$ minutos (Figura 27), apresentou-se como um derivado dissulfatado mantendo apenas um dos grupos protetores nP (MM=990 g/mol), como ilustrado pelo espectro de massa da Figura 29 (pico-base observado a m/z 990,27 u.m.a.). Por último, o espectro de massa reproduzido na Figura 30 (pico-base observado a m/z 1060,35 u.m.a.) permitiu identificar o componente A, com $t_r=15,1$ minutos (Figura 27), como o produto esperado após a clivagem da peptidil-resina, ou seja, o hexapéptido dissulfatado e ainda protegido, **DsY(nP)DEsY(nP)G** (MM=1061 g/mol). Estes resultados demonstram que a clivagem pode ocorrer conforme pretendido, mas acompanhada da perda parcial de grupos nP e de grupos sulfato. Ainda assim, optou-se por prosseguir com o estudo da remoção dos grupos nP usando o péptido-modelo impuro, para o que se aplicou o método do acetato de amónio descrito na secção 3.7.1.

NV-hexapeptido-OR #269-290 RT: 12,57-13,51 AV: 22 NL: 6,00E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

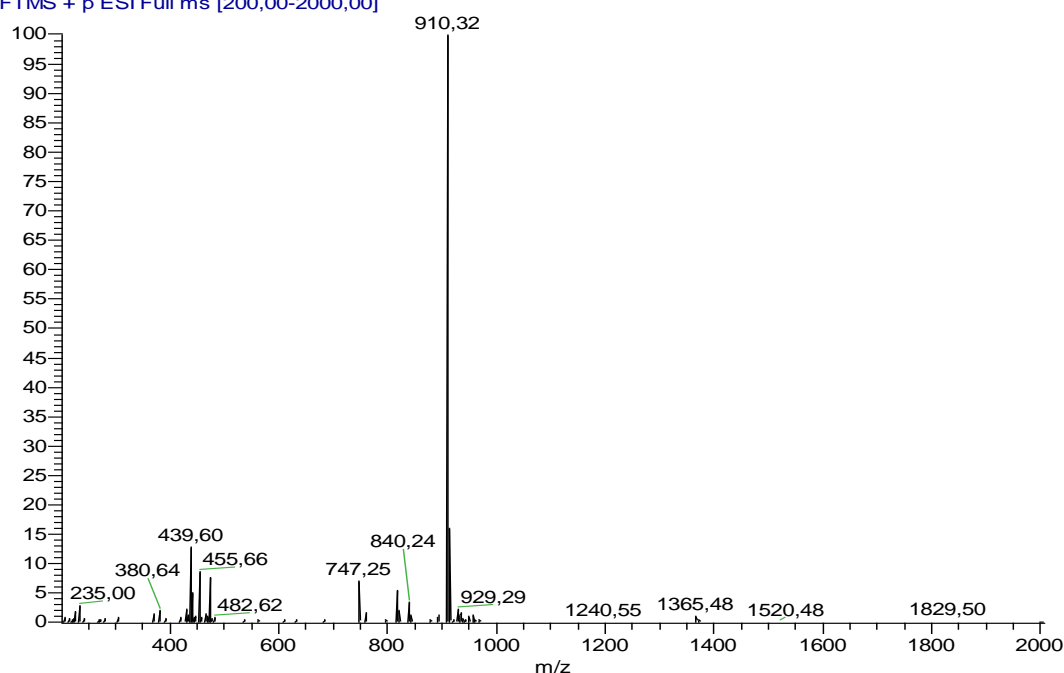


Figura 28: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B ($t_r=14,2$ minutos, ver Figura 27) do produto bruto de síntese do hexapéptido modelo.

NV-hexapeptido-OR #354 RT: 16,46 AV: 1 NL: 2,30E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

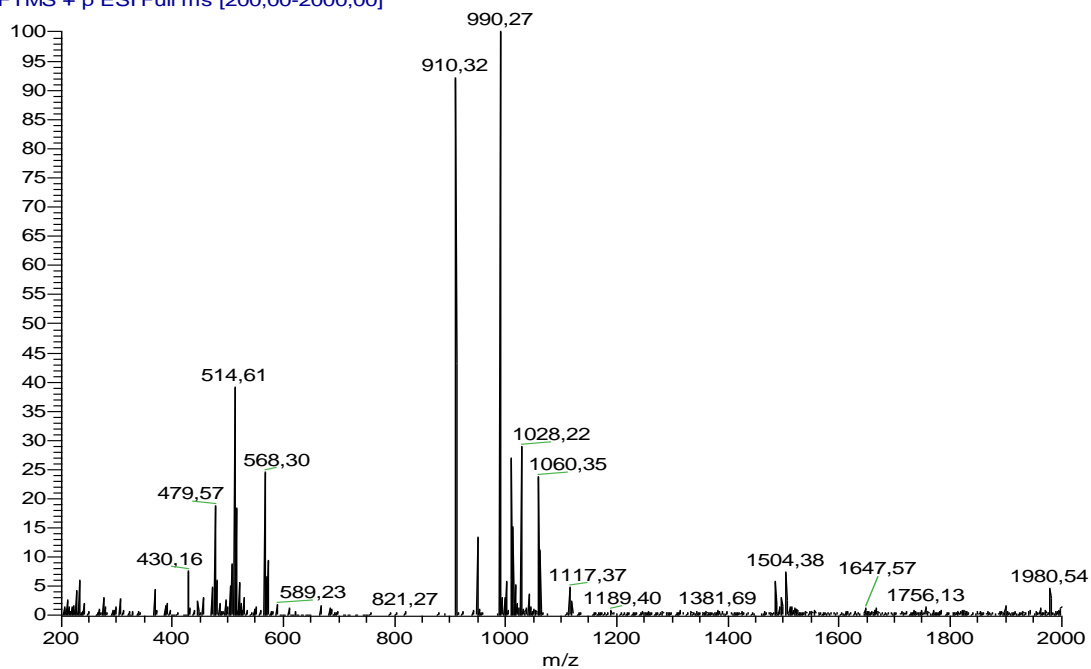


Figura 29: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C ($t_r=14,4$ minutos, ver Figura 27) do produto bruto de síntese do hexapéptido modelo.

NV-hexapeptido-OR #366 RT: 17,01 AV: 1 NL: 2,53E5
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

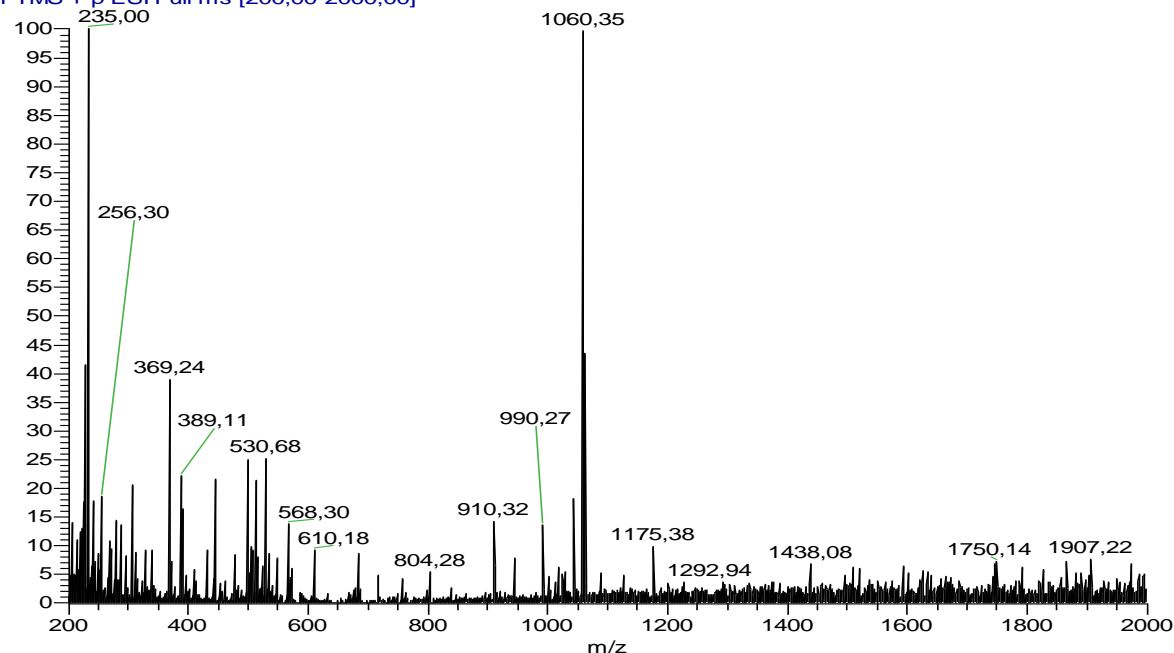


Figura 30: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A ($t_r=15,1$ minutos, ver Figura 27) do produto bruto de síntese do hexapéptido modelo.

Como anteriormente observado para o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$, também o tratamento do hexapéptido modelo com acetato de amónio conduziu a uma mistura algo complexa (Figura 31), mas diferente da mistura de partida, demonstrando a ocorrência de transformações químicas. O produto bruto de desproteção foi caracterizado por cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa, com o intuito de identificar os componentes A' a E' (Figura 31). Tal análise permitiu identificar o componente A' ($t_r=4$ minutos, Figura 31) como o hexapéptido totalmente dessulfatado (MM=760 g/mol), uma vez que apresentou um espectro de massa (Figura 32) cujo pico-base foi observado ao valor de m/z de 760,28 u.m.a. O componente B' ($t_r=8,1$ minutos, Figura 31) foi identificado como um dos péptidos monossulfatados possíveis (MM=840 g/mol), de acordo com o espectro de massa reproduzido na Figura 33 (pico-base observado a m/z 840,24 u.m.a.). Relativamente ao componente C' ($t_r=8,5$ minutos), foi identificado como sendo um derivado monossulfatado ainda protegido com o grupo neopentilo (MM=910 g/mol), como ilustra o espectro de massa da Figura 34 pico-base observado a m/z 910,32 u.m.a.. Os componentes D' e E', respetivamente com tempos de retenção de 6,0 e 8,3 minutos (Figura 31), não foram identificados de forma conclusiva; os respetivos espectros de massa apresentaram picos-base a valores de m/z de 562,14 u.m.a (Figura 35) e 937,22 u.m.a. (Figura 36).

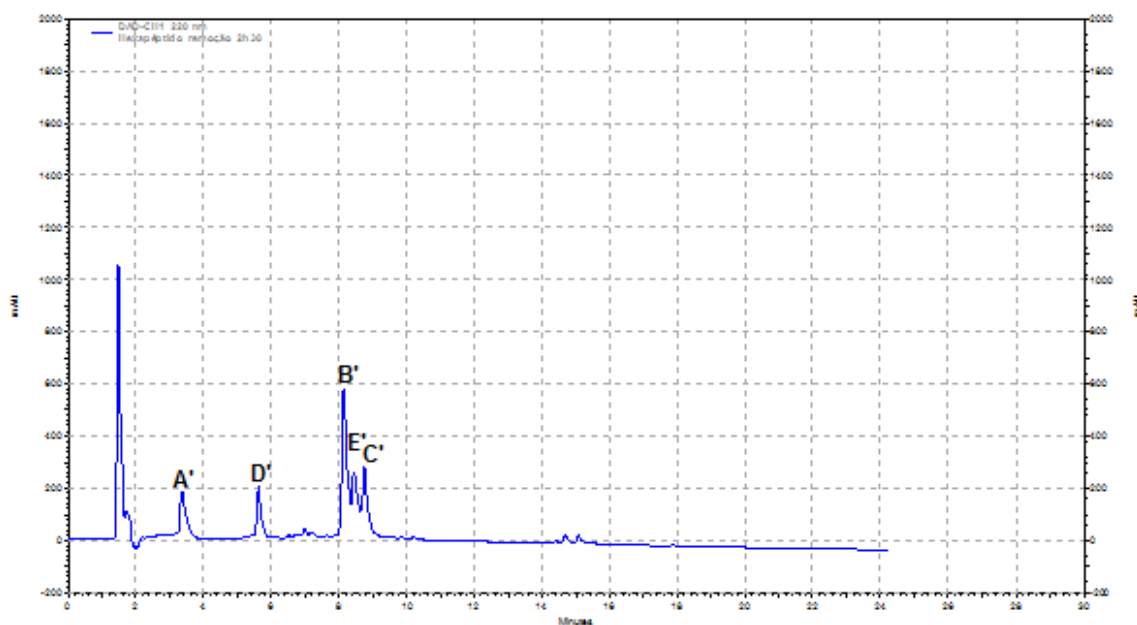


Figura 31: Cromatograma do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetona nitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

NV-Hexapeptido-OYDEYG_remocao_2h #144-152 RT: 6,79-7,17 AV: 9 NL: 5,45E5
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

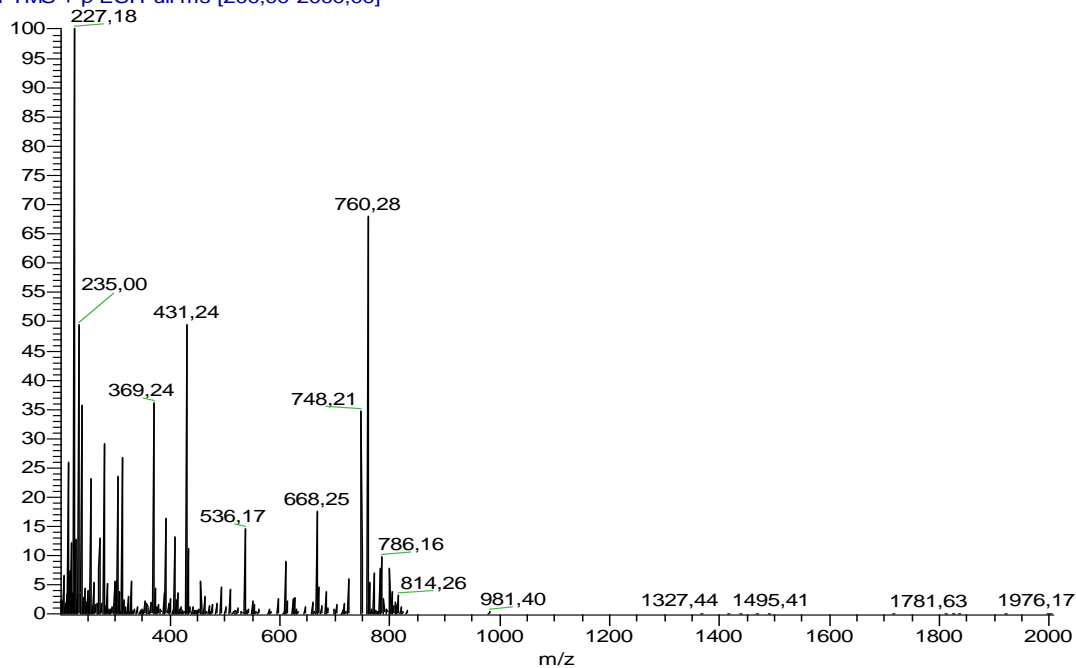


Figura 32: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' (t_r=4 minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.

NV-Hexapeptido-OYDEYG_remocao_2h #171-180 RT: 8,08-8,50 AV: 10 NL: 8,73E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

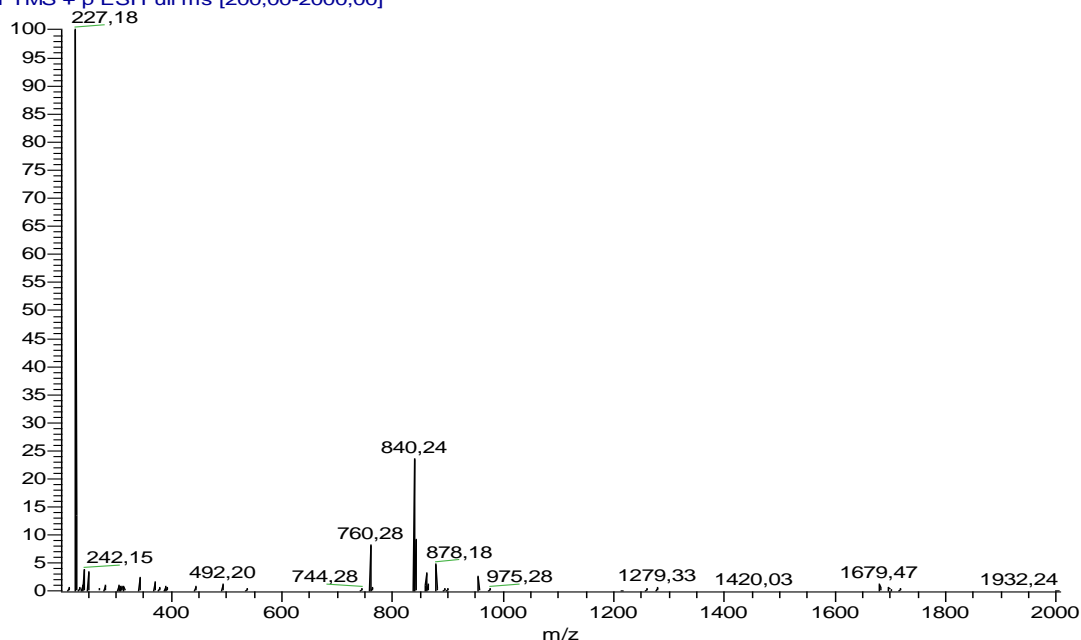


Figura 33: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B' (t_r=8.1 minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.

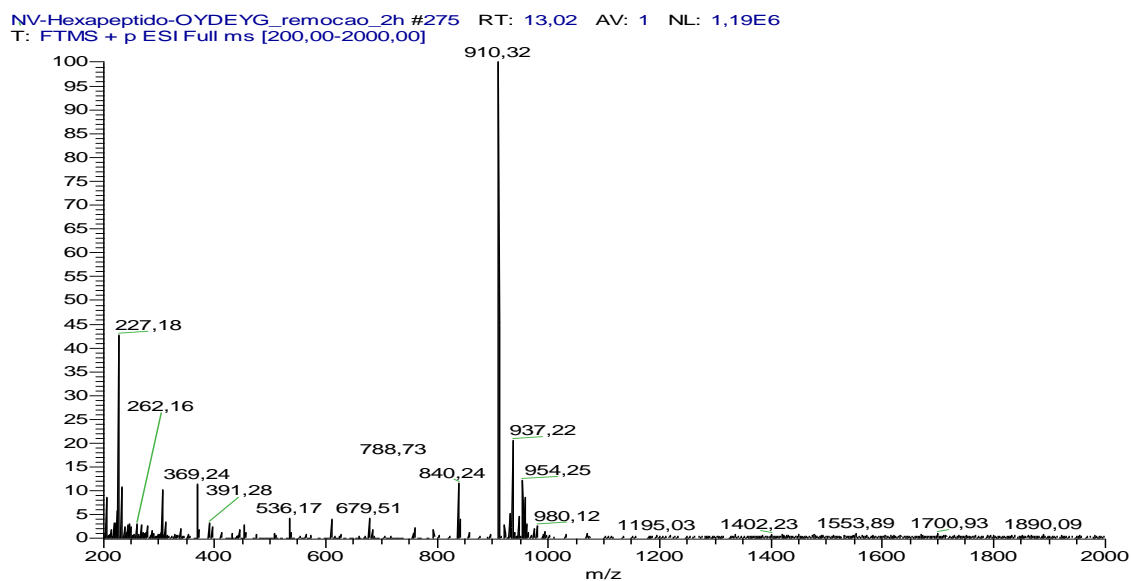


Figura 34: . Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C' ($t_r=8.5$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.

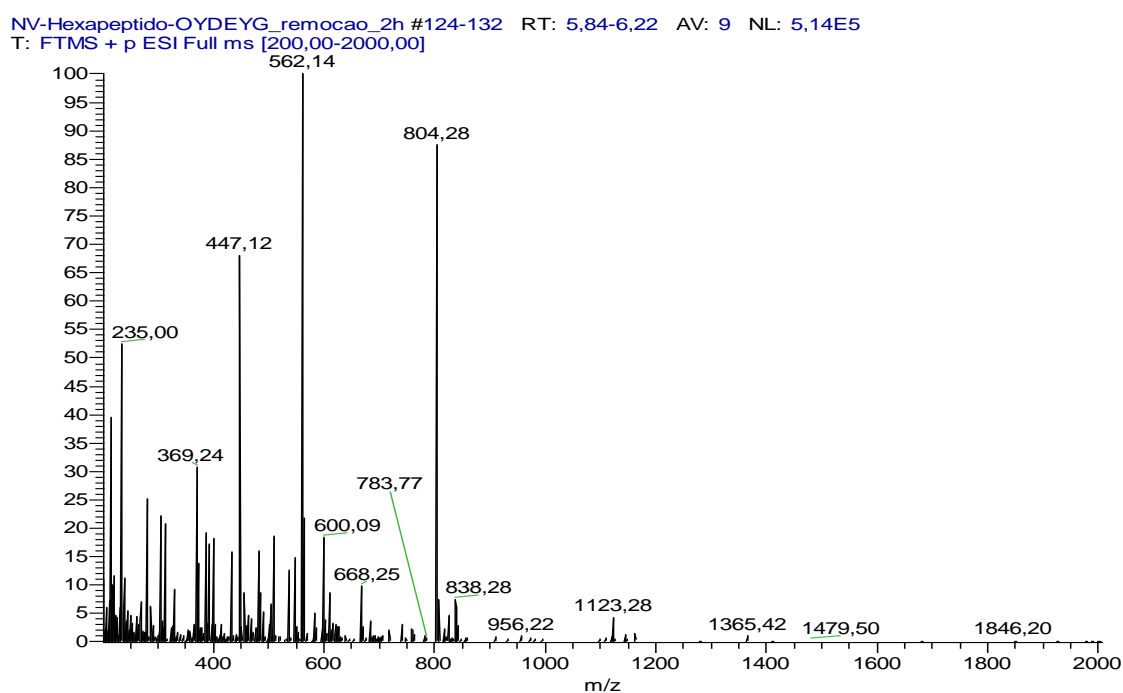


Figura 35: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente D' ($t_r=6,0$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.

NV-Hexapeptido-OYDEYG_remocao_2h #250-256 RT: 11,83-12,12 AV: 7 NL: 5,81E5
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-2000,00]

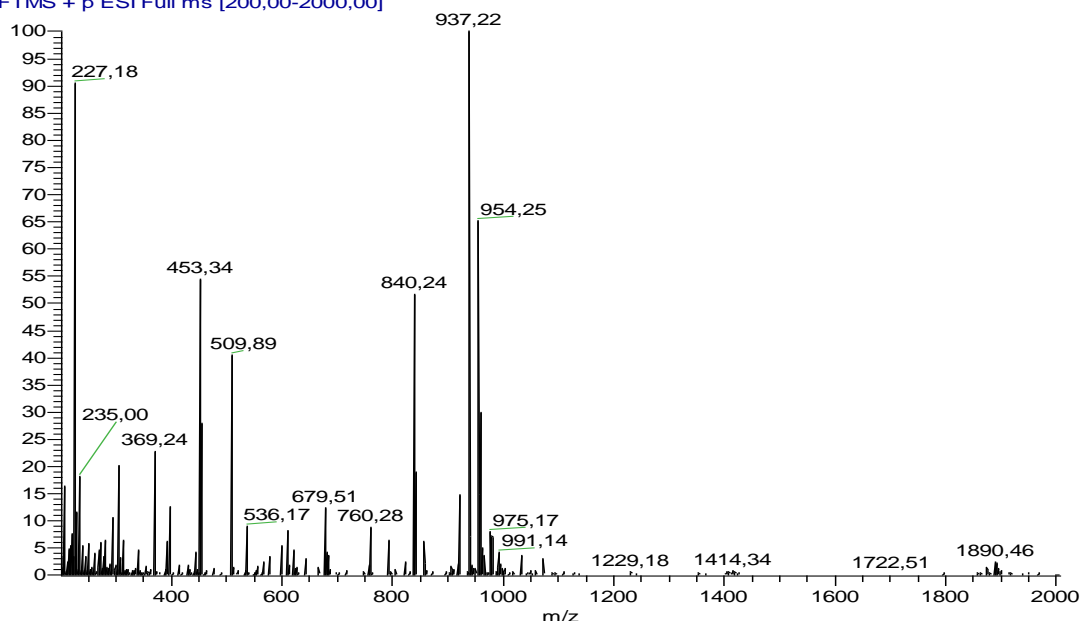


Figura 36: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente E' ($t_r=8,3$ minutos, ver Figura 31) do produto bruto obtido após aplicação de condições de remoção do grupo nP ao hexapéptido modelo impuro.

Nenhum dos componentes do produto bruto de desproteção foi identificado como o hexapéptido pretendido, **DsYDEsYG**, concluindo-se que as dificuldades de remoção dos grupos nP no péptido dissulfatado original $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ não estariam a ser substancialmente afetadas pelo tamanho deste péptido. Assim, decidiu-se retomar o péptido dissulfatado protegido, $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$, para prosseguir com o estudo detalhado de condições alternativas de remoção do grupo nP. Para o efeito, foi necessário repetir a síntese deste péptido, tendo-se optado por abordar essa síntese por via automática assistida por micro-ondas. Esta opção teve por base dois propósitos, nomeadamente, (a) verificar se a incorporação de resíduos de Fmoc-sTyr(nP)-OH decorre de forma normal em SPPS assistida por micro-ondas e (b) obter o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)}\text{-TTI}$ do modo mais rápido possível, de forma a completar-se o estudo pretendido dentro do tempo disponível para conclusão da Dissertação.

4.4. Nova abordagem à síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$

4.4.1. Síntese do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ por MW-SPPS automatizada

Sintetizou-se a sequência completa do $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$, à escala de 0,2 mmol sobre uma resina do tipo Fmoc-Rink com 0,38 mmol/g de funcionalização, por via automatizada assistida por micro-ondas usando o equipamento Liberty1 a CEM.

Após o término do alongamento da sequência peptídica, procedeu-se à clivagem da peptidil-resina conforme as condições descritas na secção 3.6.1. Assim, deixou-se a peptidil-resina reagir com um cocktail de clivagem constituído por TFA (95%), TIS (2,5%) e H_2O (2,5%), procedendo-se depois à filtração da suspensão, obtendo-se o péptido bruto dissolvido. Uma vez concluído o tratamento adequado de precipitação e lavagem (ver secção 3.6.1.), dissolveu-se uma pequena amostra do produto isolado em água, para análise por HPLC (Figura 37) e espetrometria de massa (dados não mostrados). Como se pode verificar na figura 37, o perfil cromatográfico obtido apresentou melhor qualidade que o resultante da síntese manual do $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ (ver secção 4.2.2.4). A análise por espetrometria de massa permitiu confirmar a formação do péptido desejado, correspondente ao componente A com tempo de retenção de 16 minutos, visto que o pico-base apresentou um valor de m/z de compatível com o aduto triprotonado ($[\text{P}+3\text{H}]^{3+}$) (dados não mostrados). O componente B, com tempo de retenção 14,1 minutos, foi identificado como um dos possíveis derivados monossulfatados do péptido TTI, ao passo que não se logrou identificar, de modo conclusivo, o componente C ($t_r = 14.3$ minutos).

Uma vez que o péptido-alvo correspondeu ao componente maioritário do produto bruto de síntese, decidiu-se avançar com este para novos estudos de remoção dos grupos protetores nP, descritos na secção seguinte (4.4.2).

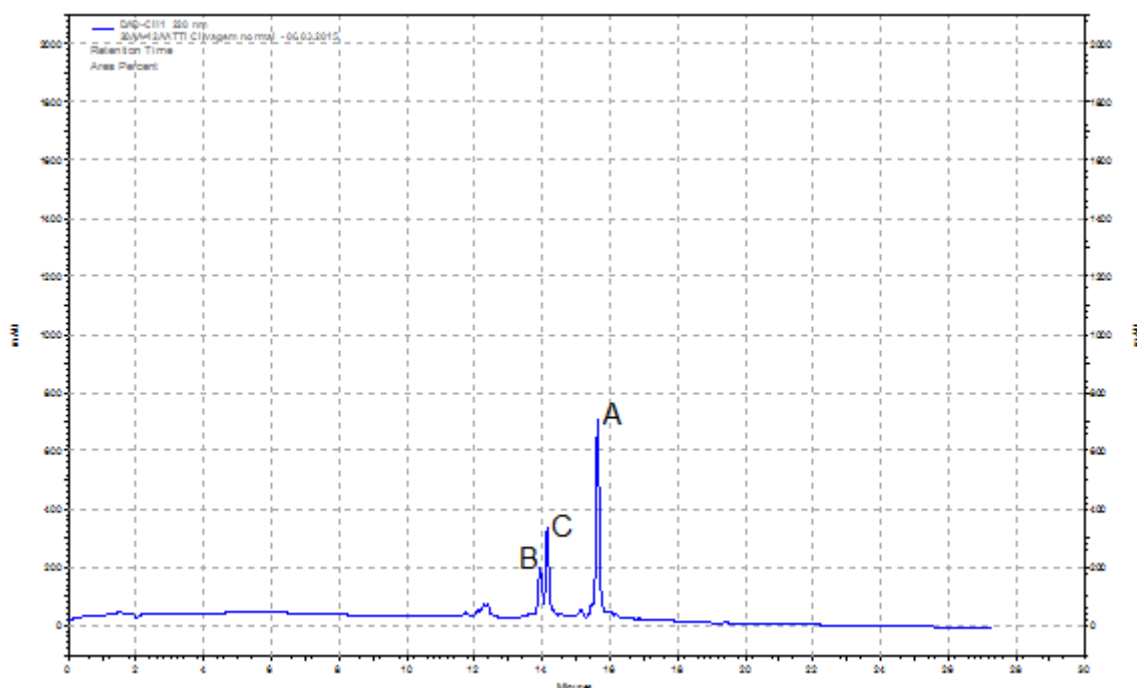


Figura 37: Cromatograma do péptido bruto $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ sintetizado automaticamente, obtido por clivagem de acordo com o procedimento descrito em 3.6.1. Análise realizada em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220\text{ nm}$.

4.4.2. Desproteção do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ por remoção de grupos nP

Nas anteriores abordagens à remoção dos grupos nP do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ pelo método do acetato de amónio, foram recorrentemente obtidos resultados indesejados. Assim, decidiu-se dividir o péptido protegido em diferentes porções, usando cada uma delas para testar outros métodos e condições de desproteção, conforme descrito em seguida.

4.4.2.1. Método da azida de sódio [42,43]

Foi possível encontrar, na literatura, registos de sucesso da remoção de grupos nP por tratamento dos péptidos com azida de sódio [42,43]. Com base nesses registos, decidiu-se testar a aplicação deste reagente de duas formas diferentes: usando, respetivamente, dimetilsulfóxido (DMSO) [42] ou água ultra-pura [43] como solvente.

a) uso de DMSO como solvente

Usaram-se condições baseadas em relatos da literatura [42] e descritas no ponto 3.7.2, sendo o péptido protegido solubilizado na quantidade mínima de DMSO, adicionando-se de seguida azida de sódio (10 eq.). A mistura foi deixada a incubar a 50 °C sob agitação, acompanhando-se o progresso da reação por HPLC. Observado o consumo total do péptido protegido ao fim de 4 h de reação, analisou-se o produto bruto de desproteção por HPLC, obtendo-se o perfil cromatográfico apresentado na Figura 38. Assim, foram detetados dois componentes principais, A' e B', respetivamente, aos tempos de retenção de cerca de 10 e 12 minutos.

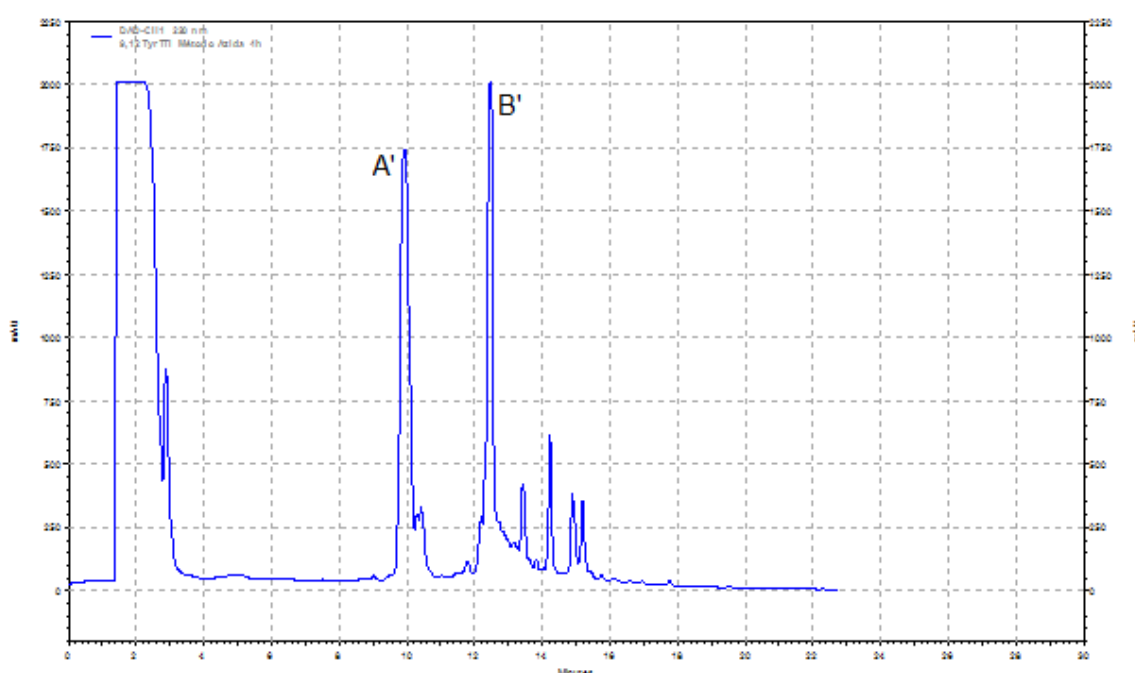


Figura 38: Cromatograma do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro com azida de sódio em DMSO. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

A mistura foi analisada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, constatando-se que o componente maioritário (A') correspondia ao péptido TTI, ou seja, atestando a perda total dos sulfatos como o processo favorecido nas condições de reação (dados não mostrados). Não se logrou identificar, de forma conclusiva, o segundo componente mais abundante (B'), cujo pico-base apresentou um valor de m/z 1200 u.m.a., nem se conseguiu fazer corresponder o péptido-alvo, $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$, a nenhum dos restantes componentes detetados (dados não mostrados).

b) uso de água ultra-pura como solvente

Usaram-se condições baseadas em relatos da literatura [43] e descritas no ponto 3.7.3, sendo preparada uma suspensão do péptido protegido em água ultrapura e adicionando-se azida de sódio (50 eq.). A mistura foi incubada a 70 °C, sob agitação, sendo o progresso da reação acompanhado por HPLC. Verificando-se o consumo total do péptido protegido ao final de 2 h, procedeu-se à análise da mistura reacional por HPLC. O perfil cromatográfico obtido (Figura 39) apresentou-se significativamente mais simples do que o obtido antes, quando se empregou igualmente azida de sódio, mas usando DMSO como solvente e levando a reação a cabo a 50 °C (Figura 38).

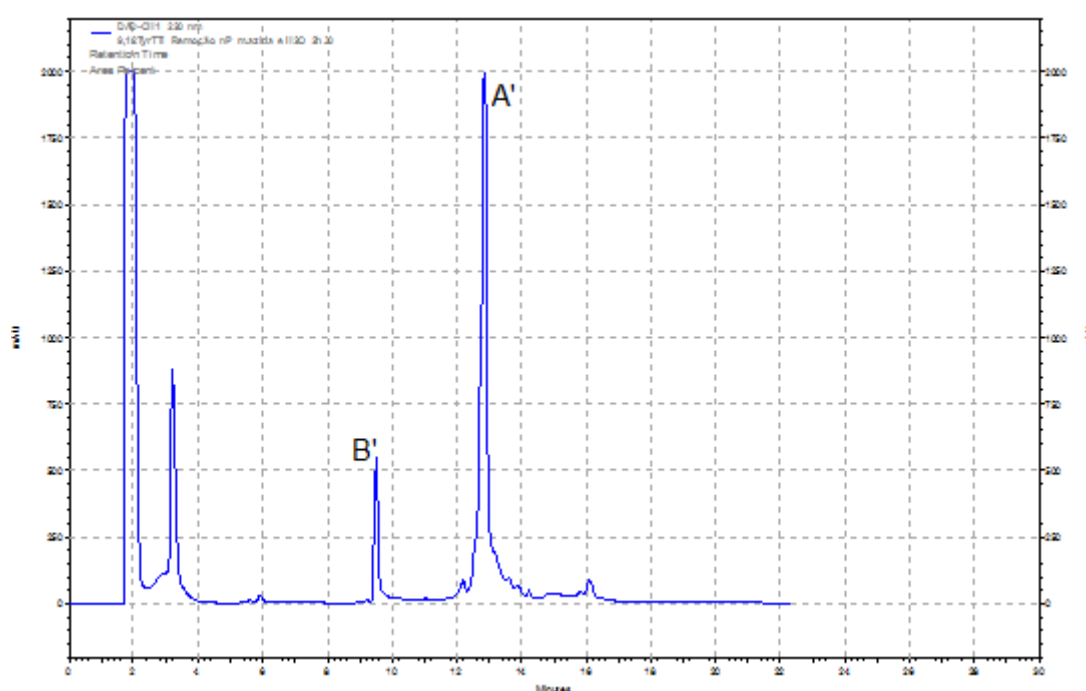


Figura 39: Cromatograma do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro com azida de sódio em água ultra-pura. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

A análise da mistura por cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa permitiu, desta vez, identificar o produto principal (A' , $t_r=13$ minutos) como sendo o péptido-alvo, como ilustra o respetivo espetro de massa (Figura 40), cujos picos mais intensos surgem a valores de m/z respetivamente compatíveis com os adutos tri- ($m/z = 1177,51$ u.m.a.) e diprotonado ($m/z = 1765,76$ u.m.a.) do péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$ (Tabela 13). O segundo componente mais abundante da mistura reacional (B' , com $t_r=9,5$ minutos) foi identificado como um derivado monossulfatado do TTI, de acordo com o espetro de massa reproduzido na Figura 41 (pico-base e segundo pico

mais intenso detetados a valores de m/z de, respetivamente, 1150,52 e 1725,78 u.m.a., compatíveis com os adutos tri- e diprotonado de TTI monossulfatado, ver Tabela 14). Portanto, a aplicação do método da azida de sódio em água ultra-pura permitiu, pela primeira vez, obter o péptido desprotegido desejado, $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$. Assim, foi possível verificar que não só o método, como também as condições experimentais específicas usadas, têm grande influência no resultado da remoção dos grupos nP.

NV-9-12_TyrII-Azida #128-134 RT: 10,83-11,32 AV: 7 NL: 4,00E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-3500,00]

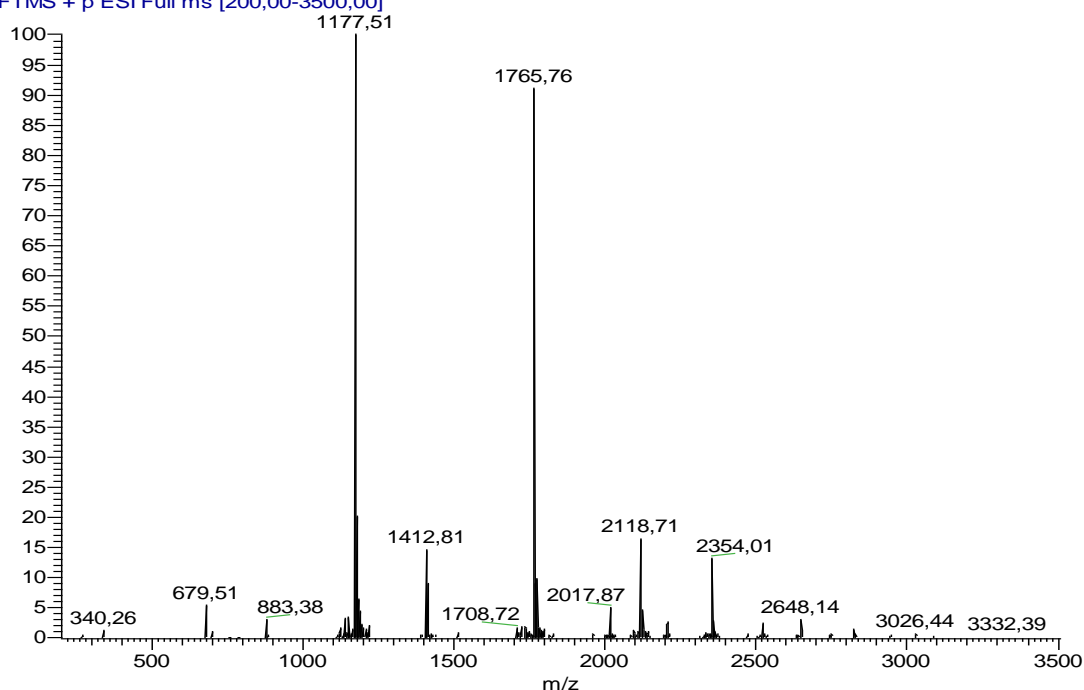


Figura 40: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente A' ($t_r=13$ minutos, ver Figura 38) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com azida de sódio em água ultra-pura.

Tabela 13: Adutos protonados do péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1765,43	1765,76
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1177,23	1177,51

NV-9-12_TyrII-Azida #119-126 RT: 10,08-10,66 AV: 8 NL: 3,14E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200,00-3500,00]

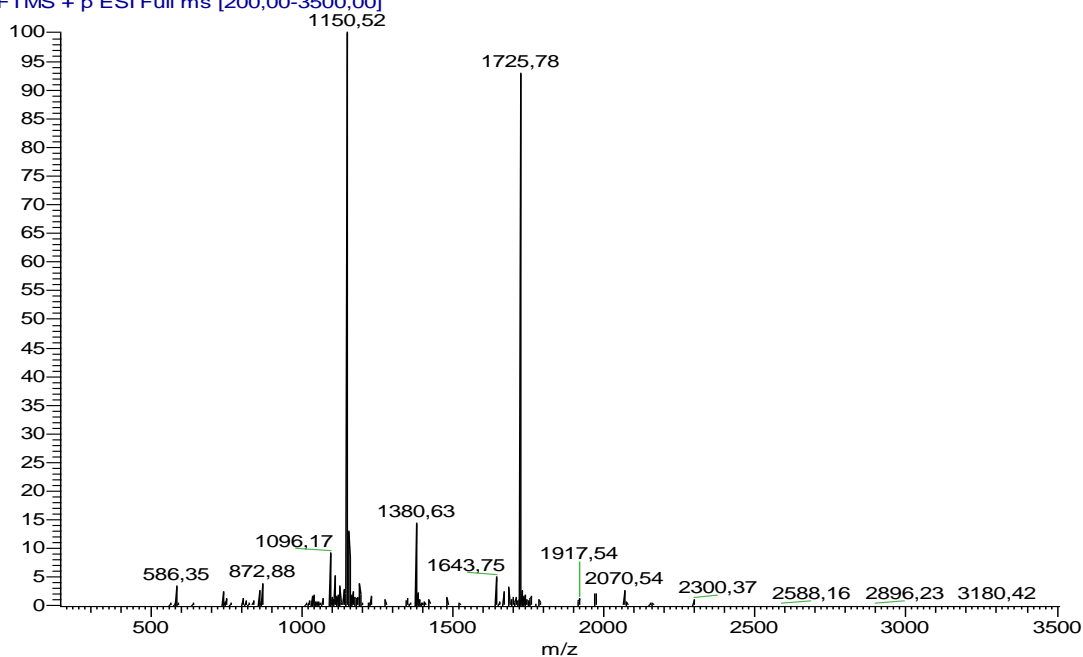


Figura 41: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B' ($t_r=9,5$ minutos, ver Figura 38) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com azida de sódio em água ultra-pura.

Tabela 14: Adutos protonados de um derivado monossulfatado do TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1725,35	1725,78
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1150,53	1150,52

4.4.2.2. Método do acetato de amónio

Atendendo aos resultados descritos na secção anterior, dos quais se inferiu a significativa dependência do sucesso da remoção dos grupos nP nas condições experimentais aplicadas, decidiu-se abordar novamente o método de remoção com acetato de amónio, tendo em atenção dois parâmetros experimentais que não se havia controlado antes (secção 4.3.2): secagem prévia do péptido protegido e pH inicial do meio reacional. Para tal, trataram-se três porções do péptido ^{9,12}sTyr(nP)-TTI com solução aquosa de acetato de amónio a 1,5 M, da seguinte forma: (a) tratamento exatamente igual ao anteriormente descrito (3.7.1), servindo como termo comparativo; (b) tratamento após secagem completa do péptido protegido; (c) tratamento após secagem e correção do pH no início da reação de desproteção. Os resultados obtidos nos três casos encontram-se descritos de seguida.

a) sem qualquer controle prévio

Realizou-se novamente a desproteção do grupo neopentilo pelo método do acetato de amónio a 1,5 M como descrito na secção 3.7.1., sem qualquer tipo de controle, de forma a servir de termo comparativo aos estudos descritos nas secções posteriores. O perfil cromatográfico da Figura 42 apresenta dois componentes, B' com $t_r = 12,2$ minutos e C' com $t_r = 14,1$ minutos.

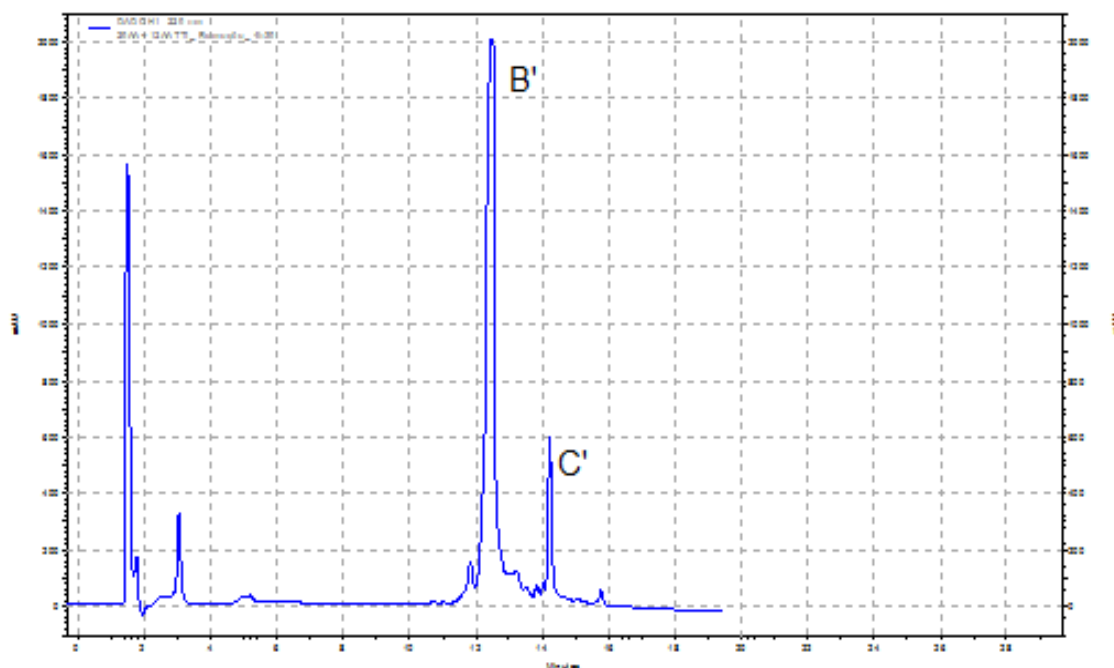


Figura 42: Cromatograma do produto bruto obtido após a aplicação das condições de remoção do grupo nP pelo Método do Acetato de Amónio ao péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

A análise por espetrometria de massa permitiu concluir que nenhum dos componentes B' e C', correspondia ao péptido-alvo pretendido. O componente maioritário, B' com $t_r=12.2$ minutos, foi identificado como um derivado monossulfatado do TTI, como ilustra o respetivo espetro de massa (Figura 43), cujo pico-base e segundo pico mais intenso surgem com m/z respetivamente compatíveis com os adutos tri- ($m/z = 1150,89$ u.m.a.) e diprotonado apresentados na Tabela 15 ($m/z = 1725,79$ u.m.a.).

A análise do segundo componente C', com $t_r=14.1$ minutos, foi inconclusiva, pois o pico-base surgiu a valor de m/z (1774 u.m.a) que não se conseguiu fazer corresponder a nenhum dos produtos expectáveis (Figura 44).

NV_20AA12AA6R #117-123 RT: 9,94-10,43 AV: 7 NL: 1,04E7
T: FTMS + p ESI Full ms [300,00-3500,00]

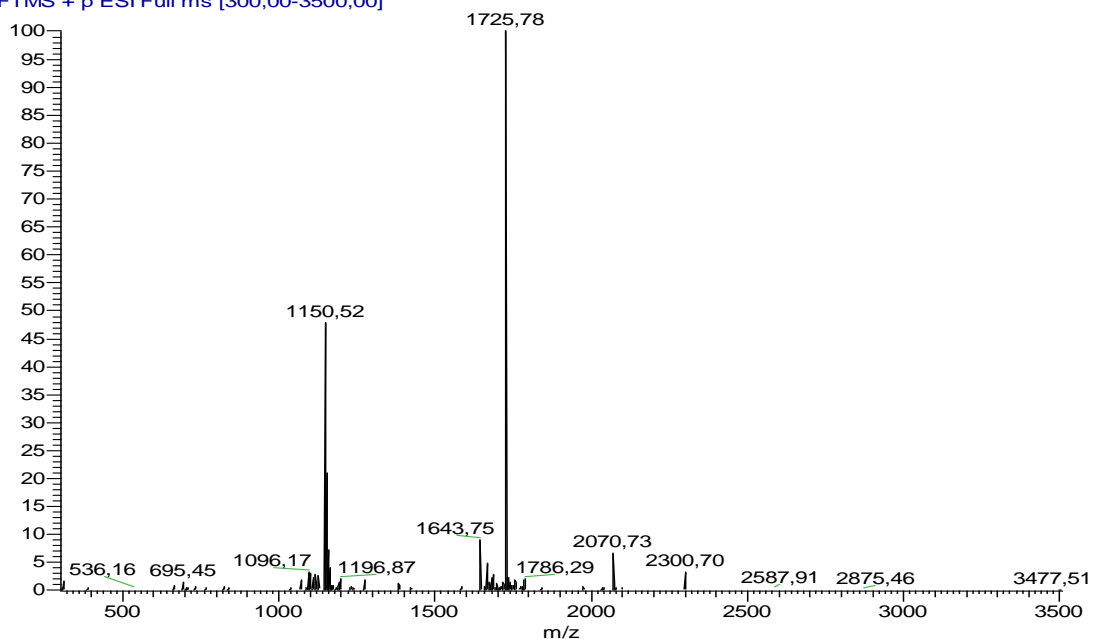


Figura 43: Espectro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente B' ($t_r=12.2$ minutos, ver Figura 41) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com acetato de amónio

Tabela 15: Adutos protonados de um derivado monossulfatado do TTI, detetados por espetrometria de massa (LC-ESI/MS Orbitrap).

Adutos	m/z esperado	m/z obtido
$[\text{P} + 2\text{H}]^{2+}$	1725,35	1725,79
$[\text{P} + 3\text{H}]^{3+}$	1150,53	1150,86

NV_20AA12AA6R #127-135 RT: 10,76-11,41 AV: 9 NL: 6,27E6
T: FTMS + p ESI Full ms [300,00-3500,00]

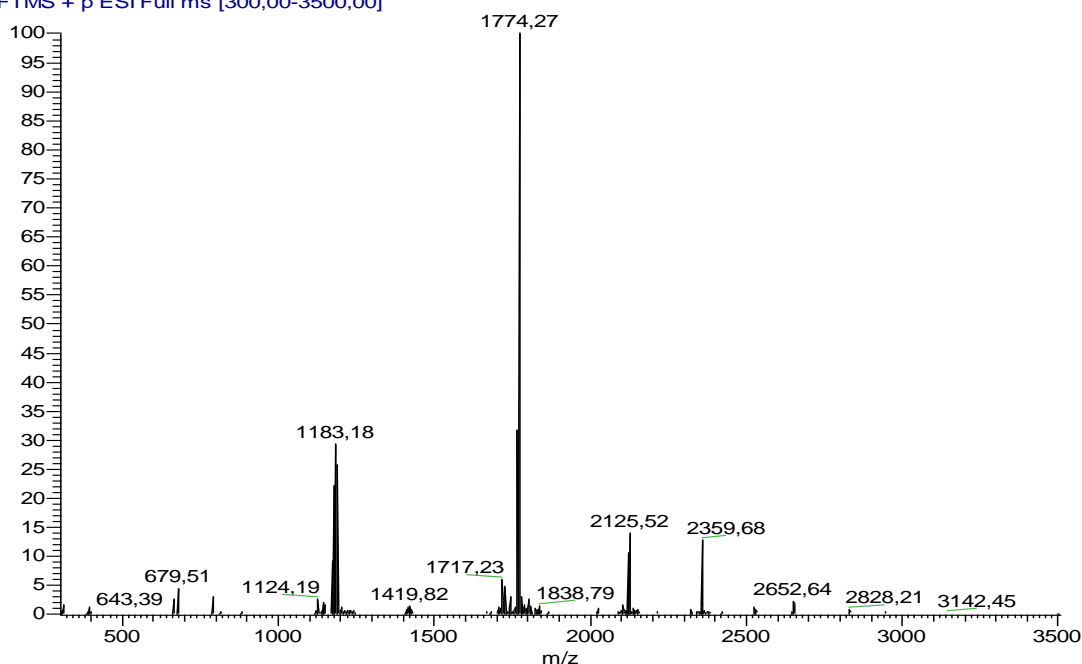


Figura 44: Espetro de massa (LC-ESI/MS Orbitrap, modo positivo) do componente C' ($t_r=14,1$ minutos, ver Figura 41) do produto bruto obtido após tratamento do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ com acetato de amónio.

b) com controle prévio da secagem do péptido protegido

Tendo por base a perda total ou parcial de grupos sulfato, recorrentemente detetada nas anteriores tentativas de obtenção do péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$, considerou-se que tal poderia ser devido a uma secagem insuficiente do precursor protegido, $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$. Assim, colocou-se uma porção do $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ clivado a secar em exsiccador de vácuo contendo cloreto de cálcio anidro, com renovação de vácuo e controle diário da variação de massa. Quando não se observou qualquer perda adicional de massa no péptido armazenado, após duas semanas, procedeu-se ao seu tratamento com acetato de amónio, de acordo com o procedimento descrito em 3.7.1. O produto bruto de desproteção obtido apresentou um perfil cromatográfico (Figura 45) que não diferiu substancialmente do anteriormente registado aquando da desproteção sem qualquer controle prévio (Figura 37). No entanto, foi possível identificar (dados não mostrados) um novo componente (B', $t_r=9,8$ minutos) como um derivado monossulfatado do péptido TTI ($^9\text{sTyr-TTI}$ ou $^{12}\text{sTyr-TTI}$). Em suma, o controle da secagem do péptido protegido, por si só, não contribuiu para o incremento da qualidade do produto de desproteção.

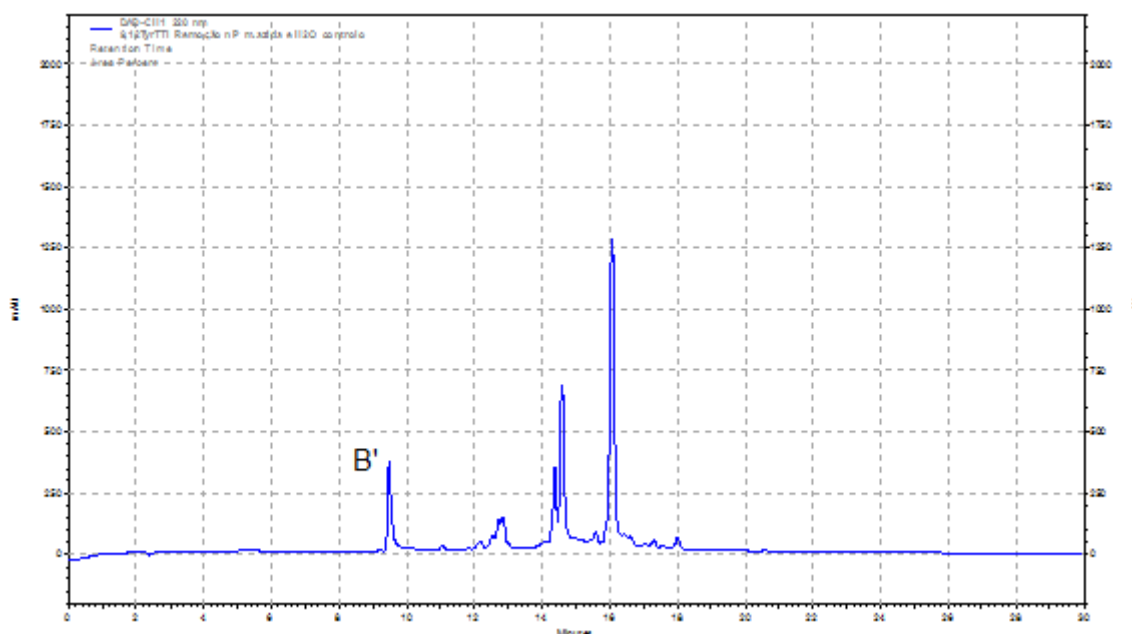


Figura 45: Cromatograma do produto bruto obtido para o péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro após controlo de secagem. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C₁₈, usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

c) com acerto do pH no início da reação de desproteção

Face aos resultados descritos na alínea anterior, decidiu-se averiguar se restos de TFA aderentes ao péptido e não eliminados na secagem poderiam, de alguma forma, afetar o resultado da remoção dos grupos nP. Assim, realizou-se um último teste, em que se mediu o pH da solução resultante da solubilização do péptido protegido seco na solução aquosa de acetato de amónio a 1,5 M (cujo pH era de 7). Verificou-se que o pH, após solubilização do péptido, havia descido para 6, pelo que se adicionou de imediato mais 1 mL da solução de acetato de amónio, obtendo-se um valor de pH final de 7. Deixou-se a mistura a reagir conforme descrito anteriormente (3.7.1), acompanhando-se o progresso da reação por HPLC.

O perfil cromatográfico obtido, que se reproduz na Figura 46, evidenciou, uma vez mais, a notável influência de pequenos ajustes experimentais no resultado da reação de desproteção. Assim, por ajuste do pH no início da reação de desproteção do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ seco, foi possível obter o péptido-alvo como produto principal. Este péptido, identificado como pico A' no cromatograma da Figura 46 ($t_r=12,8$ minutos), apresentou um espectro de massa compatível com o esperado para o péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$ (dados não mostrados).

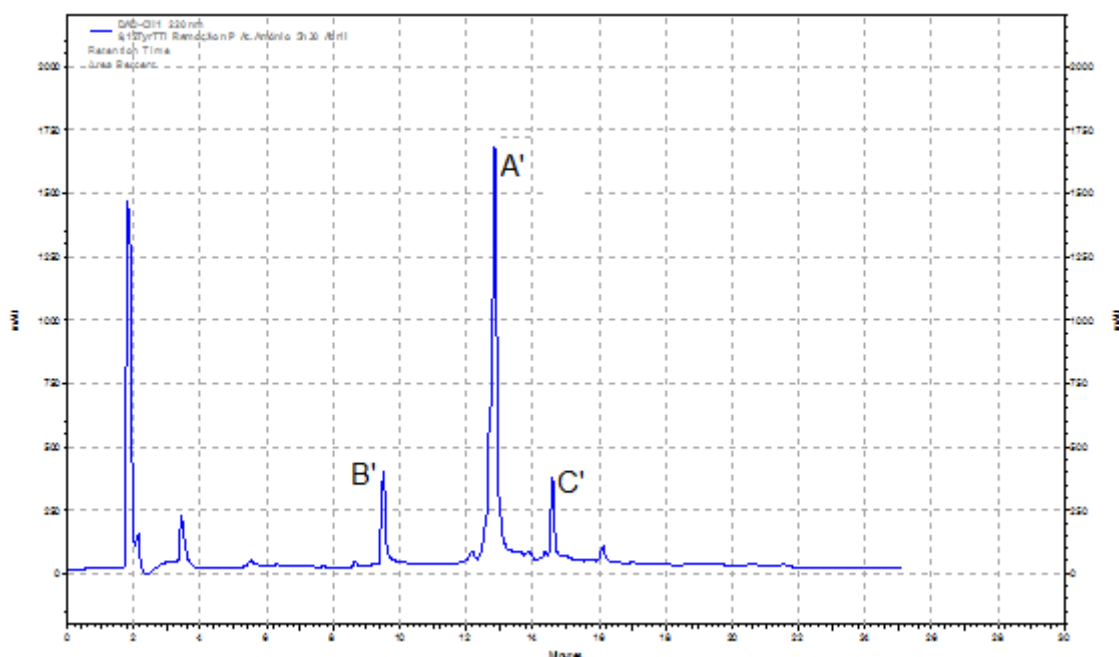


Figura 46: Cromatograma do produto bruto obtido após secagem do péptido $^{9,12}\text{sTyr(nP)-TTI}$ impuro e posterior tratamento com acetato de amónio, com acerto do pH inicial ao valor de 7. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

Em suma, após longa e cuidadosa otimização das condições experimentais, foi possível aplicar com sucesso os principais métodos de remoção de grupos nP descritos na literatura, nomeadamente, o método do acetato de amónio e o método da azida de sódio, ao péptido dissulfatado. No entanto, em ambos os métodos se constatou que ligeiras variações de condições experimentais podem ser preponderantes no desfecho final da reação de desproteção. Assim, a simples troca do solvente (entre DMSO e água ultra-pura) ditou o sucesso da aplicação do método da azida de sódio, ao passo que o controle prévio da secagem do péptido protegido e do pH inicial na reação de desproteção foram a chave para que o método do acetato de amónio funcionasse como esperado. Em ambos os casos, o péptido-alvo foi obtido como produto principal, mas com um grau de pureza ainda inferior ao necessário para estudos subsequentes. Assim, este péptido foi sujeito a uma etapa final de purificação, conforme se descreve na secção 4.5. Relativamente ao rendimento da síntese, foi de apenas 5,6%.

4.5. Purificação dos péptidos-alvo

Uma vez obtidos, os quatro péptidos-alvo foram purificados por cromatografia líquida preparativa de fase reversa a média pressão (RP-MPLC), como já foi referido anteriormente (ver secção 3.8.2). Regra geral, a purificação cromatográfica de péptidos é levada a cabo via eluição isocrática ou gradiente, usando como eluentes misturas de água e acetonitrilo, aciduladas com TFA. No entanto, devido à labilidade dos resíduos de sTyr a ácidos, esta metodologia não pode ser aplicada na purificação de sulfo-péptidos. Assim, os três péptidos sulfatados foram purificados em condições distintas das aplicadas ao péptido TTI, a seguir descrito.

4.5.1. Purificação do péptido TTI

O péptido TTI impuro foi solubilizado em solução aquosa de ácido acético a 10% e purificado por RP-MPLC, aplicando-se um gradiente de eluição de 15 a 45% de acetonitrilo em água, contendo 0,05% de TFA. O péptido foi purificado sem problemas dignos de nota, sendo o seu grau de pureza final de 98,3%, conforme determinado por HPLC (Figura 47). O péptido TTI puro foi seguidamente liofilizado, após o que se enviou para ensaios biológicos e estudos estruturais, atualmente em curso.

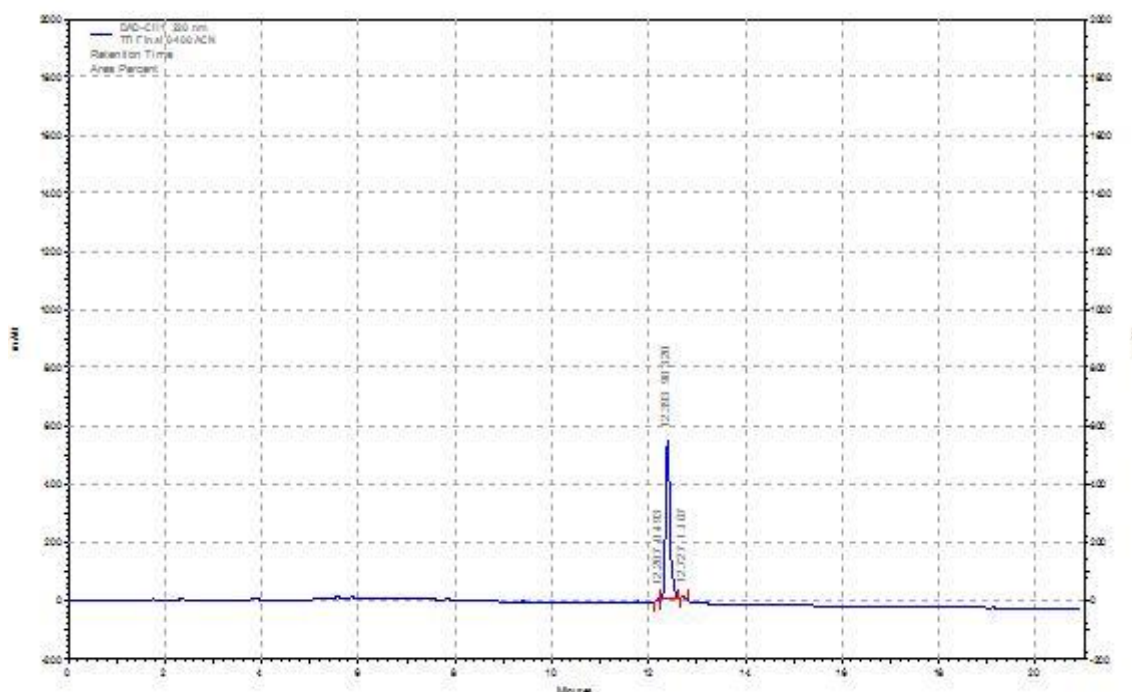


Figura 47: Cromatograma do péptido TTI puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C₁₈, usando acetonitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

4.5.2. Purificação dos derivados sulfatados do péptido TTI

Assim que se logrou obter, após reação de remoção dos grupos nP, quantidades suficientes dos péptidos sulfatados desprotegidos, procedeu-se à purificação destes por RP-MPLC. Para o efeito, um primeiro cuidado a ter prende-se com o facto de não ser aconselhável começar por solubilizar o péptido em solução aquosa de ácido acético a 10%, procedimento comum na purificação de péptidos por cromatografia líquida. De facto, no caso dos péptidos sulfatados, verificou-se experimentalmente a ocorrência de dessulfatação adicional dos péptidos quando dissolvidos na solução acética (testes não descritos). Pela mesma razão (instabilidade em meio ácido), a purificação destes péptidos não pode ser feita por eluição com misturas aciduladas de água/acetonitrilo, usando-se alternativamente misturas de acetato de amónio aquoso 0,1 M e acetonitrilo. Assim, os três derivados sulfatados do péptido TTI foram dissolvidos em solução aquosa de acetato de amónio 0,1 M, previamente à eluição, que foi realizada em modo gradiente.

O péptido $^{12}\text{sTyr-TTI}$ foi purificado através de um gradiente de eluição de 5 a 50% de acetonitrilo em solução de acetato de amónio 0,1 M, sendo isolado com um grau de pureza de 99,9%, conforme determinado por HPLC (Figura 48).

O péptido $^9\text{sTyr-TTI}$ apresentou um comportamento cromatográfico semelhante ao do seu isómero, $^{12}\text{sTyr-TTI}$, sendo igualmente purificado através de um gradiente de eluição de 5 a 50% de acetonitrilo em solução de acetato de amónio 0,1 M. Este péptido foi isolado com um grau de pureza de 99,9%, conforme determinado por HPLC (Figura 49).

O péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$ foi purificado de forma idêntica, neste caso começando-se por aplicar um gradiente de eluição de 20 a 50% de acetonitrilo em solução aquosa de acetato de amónio 0,1 M. Não se tendo obtido um grau de pureza superior a 95% (dados não mostrados), liofilizou-se a fração mais pura, que se submeteu a nova purificação cromatográfica, desta vez aplicando um gradiente de eluição de 5 a 50% de acetonitrilo em solução aquosa de acetato de amónio 0,1 M. Logrou-se obter o péptido com um grau de pureza final de 98,5%, de acordo com análise por HPLC (Figura 50).

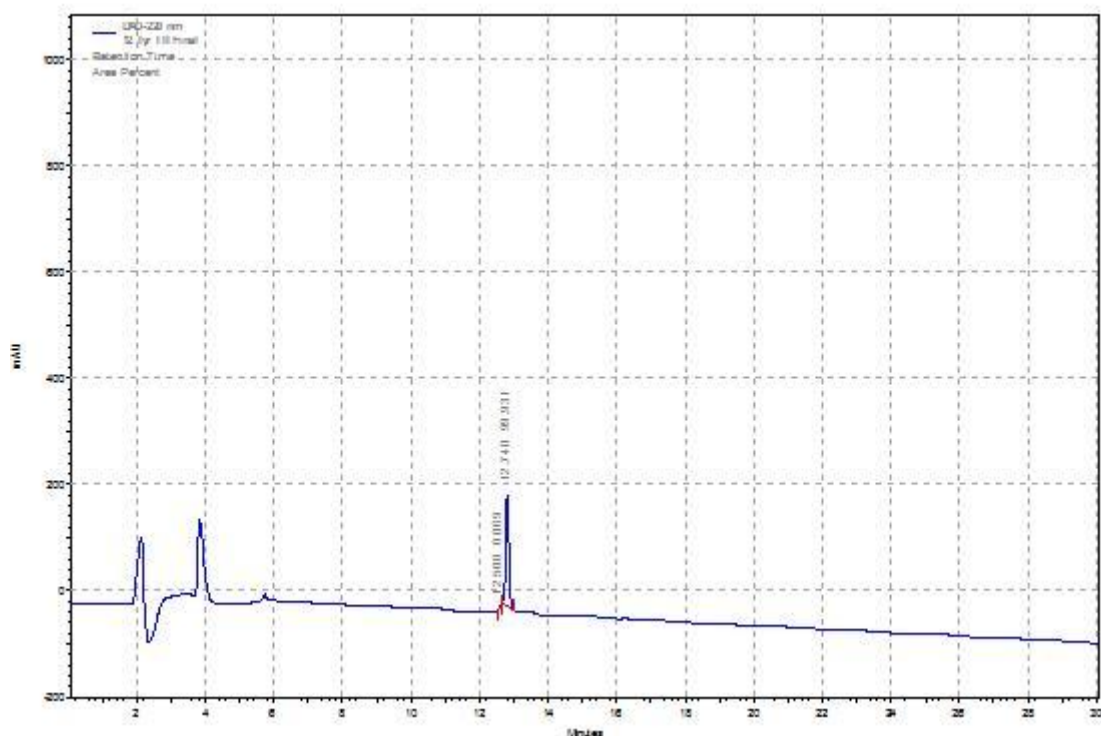


Figura 48: Cromatograma do péptido $^{12}\text{sTyr-TTI}$ puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

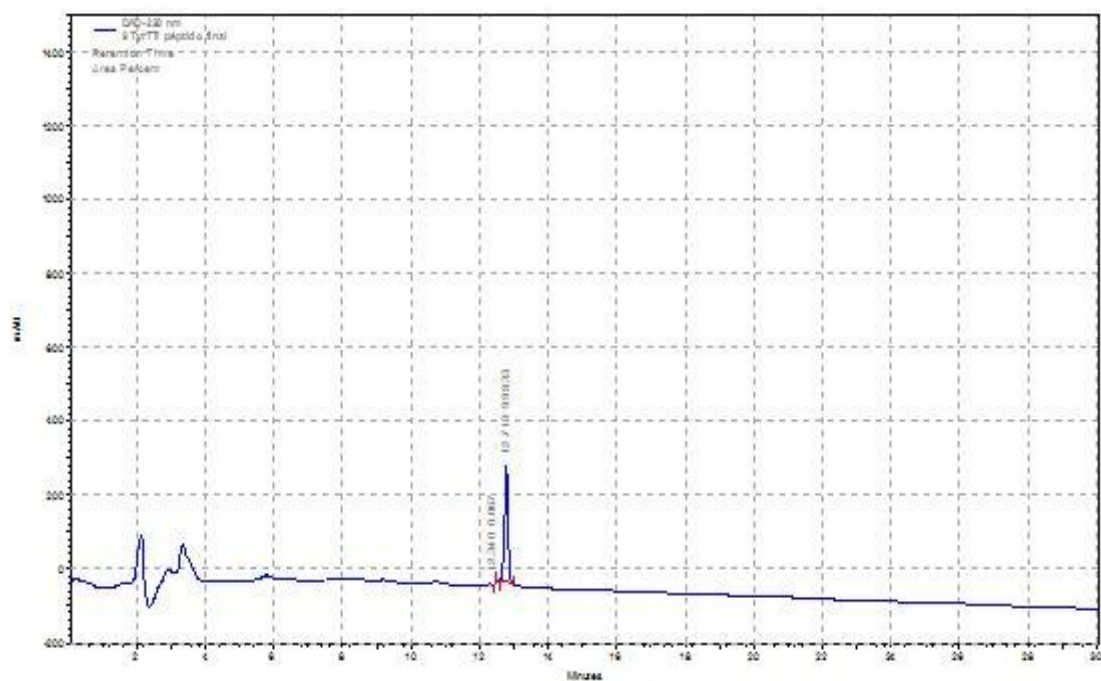


Figura 49: Cromatograma do péptido $^9\text{sTyr-TTI}$ puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

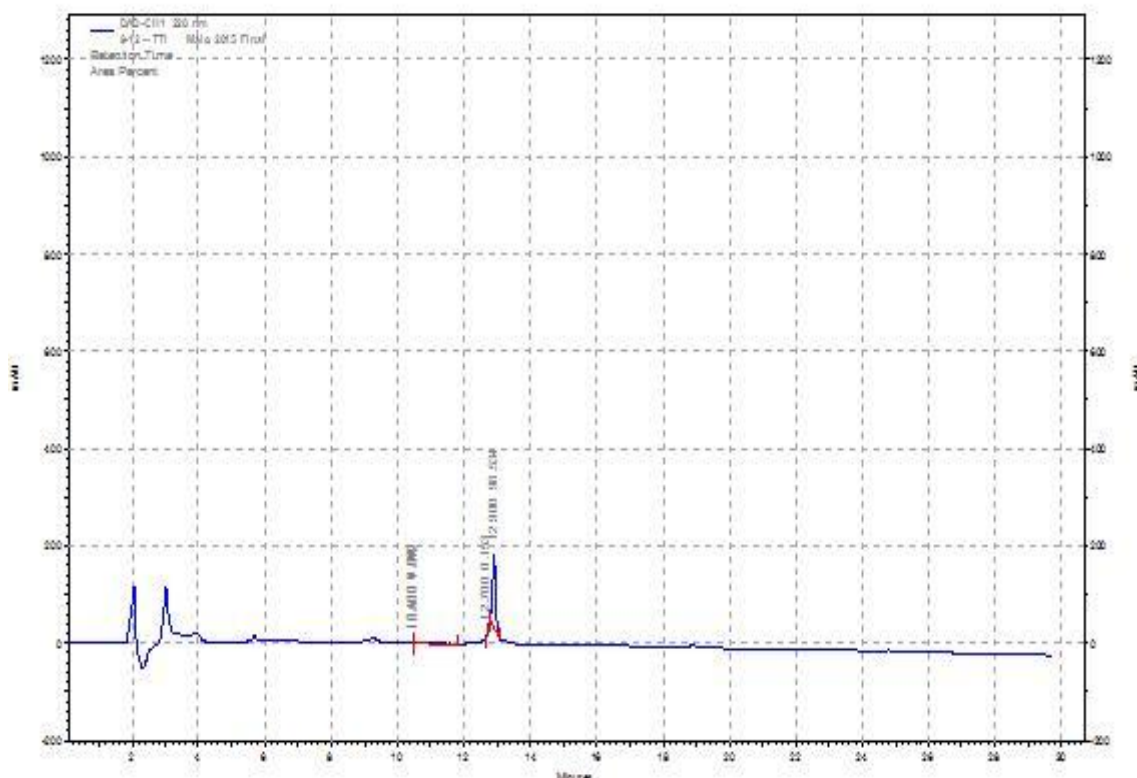


Figura 50: Cromatograma do péptido $^{9,12}\text{sTyr-TTI}$ puro. Análise em sistema HPLC-DAD com coluna C_{18} , usando acetoneitrilo em água (com 0,05% TFA) como eluente, em modo gradiente de 0 a 100% durante 30 minutos, ao fluxo de 1 mL/min e com deteção a $\lambda=220$ nm.

Os três péptidos sulfatados foram, uma vez purificados, liofilizados e enviados para ensaios biológicos e estudos estruturais, atualmente em curso. Na tabela 16 estão resumidas as condições experimentais utilizadas nos péptidos, bem como, os seus rendimentos e grau de pureza.

Tabela 16: Resumo dos resultados experimentais obtidos para o péptido TTI e suas variantes sulfatadas.

Péptido	Remoção do nP	Pureza (%)	Rendimento (%)	Massa Molar (g.mol^{-1})
TTI	Não aplicável	98,3	28,6	3369, 61
$^{12}\text{Tyr}(\text{SO}_3)-\text{TTI}$	Acetato de Amónio	99,9	10,9	3449, 66
$^9\text{Tyr}(\text{SO}_3)-\text{TTI}$	Acetato de Amónio	99,9	8,9	3449, 66
$^{9,12}\text{Tyr}(\text{SO}_3)-\text{TTI}$	1. Azida de Sódio e Água Ultrapura 2. Acetato de Amónio com Ajuste de pH	98,5	5,6	3529, 72

5. Conclusão e Perspetivas de Futuro

No fecho deste trabalho de investigação, foi possível concluir que todos os objetivos originalmente propostos foram plenamente atingidos. Logrou-se, também, constatar que a síntese de péptidos sulfatados não é um problema de abordagem experimental trivial, devido à labilidade dos grupos protetores do fenol dos resíduos de sulfo-tirosina nas condições correntemente aplicadas na síntese e purificação de péptidos. De facto, observou-se que a síntese deste tipo de péptidos requer um ajuste cuidadoso das condições de clivagem e, em especial, das condições de remoção dos grupos neopentilo, usados na proteção lateral das sulfo-tirosinas. Por outro lado, as maiores dificuldades sentidas na síntese do péptido dissulfatado, comparativamente aos derivados monossulfatados, demonstram que as condições devem ser adaptadas a cada péptido, o que sugere que os métodos atualmente existentes não são ainda suficientemente robustos para que a sua aplicação em determinadas condições conduza universalmente aos resultados previstos e desejados. Por conseguinte, e devido ao crescente interesse das biociências em sulfo-péptidos, será importante abordar outras metodologias de síntese que porventura se revelem mais universais; por exemplo, o seguimento deste projeto de investigação poderá centrar-se no estudo da aplicação do grupo diclorovinilo para a proteção lateral de sulfo-tirosinas, eventualmente proporcionando reações de desproteção lateral mais eficazes e robustas, mesmo para péptidos polissulfatados.

De qualquer forma, o presente trabalho demonstrou que, com o devido esforço de otimização, é possível obter péptidos mono- e dissulfatados com excelentes graus de pureza. Adicionalmente, este trabalho também permitiu estabelecer que se pode aplicar a síntese automatizada assistida por micro-ondas à preparação de sulfo-péptidos mediante incorporação direta de resíduos de Fmoc-sTyr(nP)-OH. Por outras palavras, o uso destes derivados comerciais da sulfo-tirosina é compatível com a aplicação de protocolos de SPPS onde as reações de desproteção (remoção de grupos de Fmoc) e acoplamento são realizadas a temperaturas substancialmente superiores à ambiente, por irradiação com micro-ondas.

Por último, espera-se ter contribuído para o avanço do conhecimento, no que diz respeito não só à síntese de péptidos sulfatados, mas também à futura elucidação da influência do grau de sulfatação do péptido TTI na sua capacidade de inibição da trombina da mosca tsé-tsé.

Referências Bibliográficas

- [1] D. Pires, M. Bemquerer, C. Nascimento, Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2014**, 20, 53-69.
- [2] E. Fischer, Ueber die Ester der Aminosäuren, *E. Dstch. Chem.*, **1901**, 34, 433-435.
- [3] S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, Chemical methods for peptide and protein production, *Molecules*, **2013**, 18, 4373-4388.
- [4] R. B. Merrifield, Solid-phase peptide synthesis I: The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
- [5] N. L. Benoiton, Solid-phase synthesis, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, **2006**.
- [6] A. El-Faham, F. Albericio, Peptide coupling reagents: more than a letter soup, *Chem. Ver.*, **2011**, 111, 6557-6602.
- [7] J. H. Adams, R. M. Cook, D. Hudson, V. Jammalamadaka, M. H. Lyttle, M. F. Songster, A reinvestigation of the preparation, properties and applications of aminomethyl and 4-methylbenzhydrylamine polystyrene resins, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 3706-3716.
- [8] L. A. Carpino, G. Y. Han, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 3404-3409.
- [9] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, Amino acid-protecting group, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455-2504.
- [10] M. Amblard, J. Fehrentz, J. Martinez, G. Subre, Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, *Mol. Biotechnol.*, **2006**, 33, 239-253.
- [11] W. Zheng, Y. RuLei, Z. JunDong, Z. XiaoXia, PEG-related polymer resins as synthetic supports, *Sci. China Chem.*, **2010**, 53, 1844-1852.
- [12] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einsatz substituierter triphenylmethyl-harze, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 3943-3946.
- [13] H. Rink, Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790.

- [14] F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R. I. Masada, D. Hudson, G. Barany, Preparation and application of 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 3730-3747.
- [15] P. Sieber, A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 2107-2110.
- [16] J. Choi, T. Lee, J. Byun, Y. Lee, Preparation of a core-shell type MBHA resin and its application for solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 4272-4275.
- [17] C. A. G. Montalbetti, V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827-10852.
- [18] S. Prochazkova, K. M. Varum, K. Ostgaard, Quantitative determination of chitosans by ninhydrin, *Carbohydr. Polym.*, **1999**, *38*, 115-122.
- [19] R. B. Merrifield, Automated synthesis of peptides: Solid-phase peptide synthesis, a simple and rapid synthetic method, has now been automated, *Science*, **1965**, *150*, 178-185.
- [20] S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, Microwave heating in solid-phase peptide synthesis, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1826-1844.
- [21] F. Rizzolo, C. Testa, D. Lambardi, M. Chorev, M. Chelli, P. Rovero, A. M. Papini, Conventional and microwave-assisted SPPS approach: a comparative synthesis of PTHrP(1-34)NH₂, *J. Pept. Sci.*, **2011**, *17*, 708-714.
- [22] J. M. Collins, S. K. Singh, G. S. Vanier, Microwave technology for solid phase peptide synthesis: It is not just for difficult peptides, *Chem. Today*, **2012**, *30*, 26-29.
- [23] V. Mäde, S. Els-Heindl, A. B. Beck-Sickinger, Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, *10*, 1197-1212.
- [24] S. Abu-Baker, P. Garber, B. Hina, T. Reed, G. Shahrokh, M. Al-Saghir, G. Lorigan, Microwave assisted peptide synthesis as a new gold standard in solid phase peptide synthesis: Phospholamban as an example, *OJSTA*, **2014**, *3*, 1-4.
- [25] A. Mahindra, K. K. Sharma, R. Jain, Rapid microwave-assisted solution-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 6931-6935.

- [26] S. A. Palasek, Z. J. Cox, J. M. Collins, Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid-phase peptide synthesis, *J. Pep. Sci.*, **2007**, 13, 143-148.
- [27] X. Liu, L. R. Malins, M. Roche, J. Sterjovski, R. Duncan, M. L. Garcia, N. C. Barnes, D. A. Anderson, M. J. Stone, P. R. Gorry, R. J. Payne, Site-selective solid-phase synthesis of CCR5 sulfopeptide library to interrogate HIV binding and entry, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 2074-2081.
- [28] D. Baslved, J. R. Bundgaard, J. W. Sen, Stability of tyrosine sulfate in acidic solutions, *Anal. Biochem.*, **2007**, 363, 70-76.
- [29] T. Yagami, K. Kitagawa, C. Ainda, H. Fujiwara, S. Futaki, Stabilization of tyrosine O-sulfate residue by a cationic functional group: Formation of a conjugate acid-base pair, *J. Pept. Res.*, **2000**, 56, 239-249.
- [30] D. Taleski, S. J. Butler, M. J. Stone, R. J. Payne, Divergent side-selective solid-phase synthesis of sulfopeptides, *Chem. Asian J.*, **2011**, 6, 1316-1320.
- [31] S. Futaki, T. Taike, T. Yagami, T. Ogawa, T. Anika, K. Kitagawa, Use of dimethylformamide-sulfur trioxide complex as a sulphating agent of tyrosine, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1990**, 1, 1739-1744.
- [32] H. C. Reitz, R. E. Ferrel, H. Fraenkel-Conrat, H. S. Olcott, Action of sulfating agents on proteins and model substances I: Concentrated sulfuric acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 1024-1031.
- [33] K. Kitagawa, S. Futaki, T. Yagami, S. Sumi, K. Inoue, Solid-phase related to synthesis of cionin, a photochordate-derived octapeptide the gastrin/cholecystokinin family of peptides, and its mono-tyrosine-sulfate-containing derivatives, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1994**, 43, 196-200.
- [34] S. Futaki, T. Taike, T. Akita, K. Kitagawa, Synthesis of two tyrosine-sulphate containing peptides: Leucosukfakinin (LSK-II) and cholecystokinin (CCK)-12, using the O-*p*-(methylsulphonyl) benzy serine for the selective sulphation of tyrosine, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 8899-8914.
- [35] C. Seibert, T.P. Sakmar, Towards a framework for sulfoproteomics: Synthesis and characterization of sulfotyrosine-containing peptides, *Biopolymers*, **2007**, 90, 459-477.

- [36] T. Young, L. L. Kiessling, A strategy for the synthesis of sulfated peptides, *Angew. Chem. Int. Ed. (English)*, **2002**, 41, 3449-3451.
- [37] E. J. Corey, K. C. Nicolaou, R. D. Balanson, Y. Machida, A useful method for the conversions of azides to amines, *Synthesis*, **1975**, 9, 590-591.
- [38] K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, T. Yagami, S. Futaki, Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine- containing peptides: Part II. Total synthesis of human big gastrin-II and its C-terminal glycine-extended peptide (G34-Gly sulfate) by the solid-phase segment condensation approach, *Chem. Pharm. Bull.*, **2001**, 49, 958-963.
- [39] K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, T. Yagami, S. Futaki, M. Kogire, J. Ida, K. Inoue, Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: Total synthesis of human big gastrin-II and cholecystokinin (CCK)-391.2, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 1-10.
- [40] K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, T. Yagami, S. Futaki, Efficient solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptide using 2-chlorotrytil resin: Facile synthesis of gastrin/cholecystokinin peptides, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 599-602.
- [41] L. S. Simpson, T. S. Widlanski, A comprehensive approach to the synthesis of sulfate esters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1605-1610.
- [42] L. S. Simpson, J. Z. Zhu, T. S. Widlanski, M. J. Stone, Regulation of chemokine recognition by site-specific tyrosine sulfation of receptor peptides, *Chem. Biol.*, **2009**, 16, 153-161.
- [43] J. P. Ludeman, M. N. Robati, B. L. Wilkinson, C. Huang, R. J. Payne, M. J. Stone, Phosphate modulates receptor sulfotyrosine recognition by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2), *Org. Biol. Chem.*, **2015**, 13, 2162-2169.
- [44] M. Xie, T. S. Widlanski, A new protecting group for the synthesis of complex sulfonates, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4443-4446.
- [45] A. D. Proud, J. C. Prodger, S. L. Flitsch, Development of a protecting group for sulfate esters, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 7243-7248.
- [46] Y. Liu, I. F. Lien, S. Ruttgaizer, P. Dove, S. D. Taylor, Synthesis and protection of aryl sulfates using 2,2,2-trichloroethyl moiety, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 209-212.

- [47] A. M. Ali, B. Hill, S. D. Taylor, Trichloroethyl group as a protecting group for sulfonates and its application to the synthesis of a disulfonate analog of the tyrosine sulfated PSGL-1₄₃₋₅₀, *J. Org. Chem.*, **2008**, *74*, 3583-3586.
- [48] A. M. Ali, S. D. Taylor, Efficient solid-phase synthesis of sulfotyrosine peptides using a sulfate protecting-group strategy, *Angew. Chem. Int. Ed. (English)*, **2009**, *48*, 2024-2026.
- [49] A. Bunschoten, J. A. W. Kruijtzter, J. H. Ippel, C. J. C. Haas, J. A. G. van Strijp, J. Kemminka, R. M. J. Liskamp, A general sequence independent solid-phase method for the site specific synthesis of multiple sulfated-tyrosine containing peptides, *Chem. Commun. (Camb.)*, **2009**, *7*, 2999-3001.
- [50] F. R. Bettelheim, Tyrosine O-sulfation in peptide from fibrinogen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 2838-2839.
- [51] P. A. Baeuerle, W. B. Huttner, Tyrosine O-sulfation of yolk proteins 1,2 and 3 in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 6434-6439.
- [52] F. Monigatti, B. Hekking, H. Steen, Protein sulfation analysis-a primer, *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1764*, 1904-1913.
- [53] D. Corbeil, W. B. Huttner, Tyrosine sulfation, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier: Amsterdam, Boston, **2004**.
- [54] W. B. Huttner, Sulphation of tyrosine residues, *Nature*, **1982**, *299*, 273-276.
- [55] A. Hille, P. Rosa, W. B. Huttner, Tyrosine sulfation: A post-translational modification of proteins destined for secretion?, *FEBS Lett.*, **1984**, *177*, 129-134.
- [56] P. Rosa, G. Fumagalli, A. Zanini, W. B. Huttner, The major tyrosine-sulfated protein of the bovine anterior pituitary is a secretory protein present in gonadotrophs, thyrotrophs, mammatrophs and corticotrophs, *J. Cell Biol.*, **1985**, *100*, 928-937.
- [57] P. Rosa, A. Hille, R. W. Lee, A. Zanini, P. de Camilli, W. B. Huttner, Secretogranins I and II: Two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway, *J. Cell Biol.*, **1985**, *101*, 1999-2011.
- [58] M. C. Liu, S. Yu, J. Sy, C. M. Redmand, F. Lipmann, Tyrosine sulfation of proteins from the human hepatoma cell line HepG2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 7160-7164.

- [59] K. L. Moore, A critical posttranslational modifications in plants and animals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 14741-14742.
- [60] J. P. Ludeman, M. J. Stone, The structural role of receptor tyrosine sulfation in chemokine recognition, *Br. J. Pharmacol.*, **2014**, *171*, 1167-1179.
- [61] P. A. Baeuerle, W. B. Huttner, Tyrosine sulfations is a trans-Golgi-specific protein modification, *J. Cel Biol.*, **1987**, *105*, 2655-2664.
- [62] K. L. Moore, The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 24243-24246.
- [63] J. W. Kehoe, C. R. Bertozzi, Tyrosine sulfation: A modulator of extracellular protein-protein interactions, *Chem. Biol.*, **2000**, *7*, 57-61.
- [64] H. B. Nicholas Jr., S. S. Chan, G. L. Rosenquist, Reevaluation of the determinants of tyrosine sulfation, *Endocrine*, **1999**, *11*, 285-292.
- [65] J. Liu, S. Louie, W. Hsu, H. B. Nicholas Jr., G. L. Rosenquist, Tyrosine sulfation prevalent in human chemokine receptors important in lung disease, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2008**, *38*, 738-743.
- [66] Y. S. Yang, C. C. Wang, B. H. Chen, Y. H. Hou, K. S. Hung, Y. C. Mao, Tyrosine sulfation as a protein posttranslational modification, *Molecules*, **2015**, *20*, 2138-2164.
- [67] M. C. Liu, Y. Skakubara, M. Suiko, Role of putative O-sulfate recetor in the targeting and/or intracellular transport of tyrosine-sulfated proteins, *Cytotechnology*, **1997**, *23*, 143-149.
- [68] G. L. Rosenquist, H. B. Nicholas Jr., Analysis of sequence requirements of protein tyrosine sulfation, *Protein Sci.*, **1993**, *2*, 215-222.
- [69] G. L. Hortin, T. C. Farries, J. P. Grahan, J. P. Atkinson, Sulfation of tyrosine residues increases activity of the fourth component of complement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 1338-1342.
- [70] G. L. Hortin, Sulfation of tyrosine residues in coagulation factor V, *Blood*, **1990**, *76*, 946-953.
- [71] A. Leyte, H. B. van Schijndel, C. Niehrs, W. B. Huttner, M. P. Verbeet, K. Mertens, J. A. van Mourik, Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is

essencial for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 740-746.

[72] W. Hsu, G. L. Rosenquist, A. A. Ansari, M. E. Gershwin, Autoimmunity and tyrosine sulfation, *Autoimmun. Rev.*, **2005**, 4, 429-435.

[73] M. J. Stone, S. Chuang, X. Hou, M. Shoham, J. Z. Zhu, Tyrosine sulfation: An increasingly recognized posttranslational modification of secreted proteins, *N. Biotechnol.*, **2009**, 25, 300-315.

[74] A. Zlotnik, J. Morales, J. A. Hendrick, Recent advances in chemokines and chemokine receptors, *Cri. Rev. Immunol.*, **1999**, 19, 1-47.

[75] L. H. Jones, A. Narayanan, E. C. Hett, Understanding and applying tyrosine biochemical diversity, *Mol. Biosyst.*, **2014**, 10, 952-969.

[76] J. A. Kwong, T. Dorfman, B. D. Quinlan, J. J. Chiang, A. A. Ahmed, H. Choe, M. Farzan, A tyrosine-sulfated CCR5-mimetic peptide promotes conformational transitions in the HIV-1 envelope glycoprotein, *J. Virol.*, **2011**, 85, 7563-7571.

[77] C. Seibert, C. T. Veldkamp, F. C. Peterson, B. T. Chait, B. Volkman, T. P. Skamar, Sequential tyrosine sulfation of CXCR4 by tyrosylprotein sulfotransferase, *Biochemistry*, **2008**, 47, 11251-11262.

[78] M. Casucci, A. Bondanza, Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirected T lymphocytes, *J. Cancer.*, **2011**, 2, 378-382.

[79] J. R. Bundgaard, J. Vuust, J. F. Rehfeld, New consensus features for tyrosine O-sulfation determined by mutational analysis, *J. Biol. Chem.*, **1986**, 272, 21700-21705.

[80] Y. Ouyang, W. S. Lane, K. L. Moore, Tyrosylprotein sulfotransferase: Purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 2896-2901.

[81] A. M. Tanaka-Azevedo, K. Morais-Zani, R. J. S. Torquato, A. S. Tanaka, Thrombin inhibitors from different animals, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 2010, 1-9.

[82] S. C. Freitas, S. Maia, A. C. Figueiredo, P. Gomes, P. J. B. Pereira, M. A. Barbosa, M. C. L. Martins, Selective albumin-binding surfaces modified with a thrombin-inhibiting peptide, *Acta Biomater.*, **2014**, 10, 1227-1237.

- [83] K. R. Stark, A. A. James, Anticoagulants in vector arthropods, *Parasitol. Today*, **1996**, 12, 430-437.
- [84] J. Van den Abbeele, G. Caljon, J.F. Dierick, L. Moens, K. De Ridder, M. Coosemans, The *Glossina morsitans* tsetse fly saliva: General characteristics and identification of novel salivary proteins, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **2007**, 37, 1075-1085.
- [85] M. Cappelo, P. W. Bergum, G. P. Vlasuk, B. A. Furmidge, D. I. Pritchard, S. Aksoy, Isolation and characterization of the Tsetse thrombin inhibitor: A potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1996**, 54, 475-480.
- [86] M. Cappelo, S. Li, X. Chen, C. B. Li, L. Harrison, S. Narashimhan, C. B. Beard, S. Aksoy, Tsetse thrombin inhibitor: Bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 14290-14295.